

*Magnetbasierte Anreicherung von
zirkulierenden epithelialen tumorverdächtigen Zellen
und deren Genotypisierung*

Dissertation

*zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)*

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen-Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dipl. Ing. Katharina Walther

(geb. Voigt)

geboren am 10.10.1984 in Jena

Gutachter:

- 1.
- 2.
- 3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	i
Zusammenfassung	iv
1 Einleitung	1
1.1 Zirkulierende Tumorzellen als umstrittener Indikator in der Tumorthherapie	1
1.2 Maligne Erkrankungen.....	2
1.2.1 Mammakarzinome.....	3
1.2.1.1 Therapierichtlinien des Mammakarzinoms	4
1.2.2 Kolorektale Karzinome	7
1.2.2.1 Therapierichtlinien des Kolonkarzinoms	9
1.3 Metastasierung	10
1.4 Zirkulierende Tumorzellen.....	13
1.5 Quantifizierung und Genotypisierung zirkulierender Tumorzellen.....	15
1.5.1 Magnetische Zellseparation.....	17
1.5.2 Genetische Veränderungen in Tumoren.....	19
1.5.2.1 Genetische Veränderungen im <i>KRAS</i> -, <i>BRAF</i> - und <i>PIK3CA</i> -Gen.....	20
1.5.2.2 Genetische Veränderungen in Einzelzellen.....	21
2 Zielstellung	23
3 Methoden	24
3.1 Patientenproben.....	24
3.2 Blutaufarbeitung.....	24
3.3 Zellkultur.....	24
3.4 Zellzahlbestimmung	25
3.5 MACS-Zellseparation	25
3.6 Fluoreszenzmikroskopie	27
3.6.1 Laser Scanning-Cytometrie.....	27
3.6.2 AVISO-CellCelector	28
3.7 Fluorescence-Activated Cell Sorting	29
3.8 Einzelzellpräparation am AVISO-CellCelector	29
3.9 Nukleinsäureisolation.....	30
3.9.1 Extraktion aus Einzelzellen	30
3.9.2 Extraktion aus dem Zellverband	30
3.10 Polymerase-Kettenreaktion	31
3.11 Sequenzierung.....	33
3.11.1 Sanger-Sequenzierung.....	33

3.11.2	Pyrosequenzierung	35
3.12	Statistik.....	37
4	Ergebnisse.....	38
4.1	Magnetische Anreicherung zirkulierender epithelialer Zellen.....	38
4.1.1	Etablierung der Separationsmethode.....	38
4.1.2	Therapieabhängiger Anreicherungsseffekt zirkulierender epithelialer Zellen	49
4.2	Genotypisierung tumorverdächtiger Zellen	72
4.2.1	Etablierung der Mutationsanalysen	74
4.2.2	Mutationsanalysen von Einzelzellen am Patienten	80
5	Diskussion.....	87
6	Ausblick	106
	Quellenverzeichnis	I
	Abbildungsverzeichnis	XII
	Tabellenverzeichnis	XIV
	Materialien	XV
	Anhang	XX

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A549	Humane Lungenkarzinomzelllinie
BCR-ABL	Fusionsgen, durch Umlagerung der Gene BCR (<i>breakpoint cluster region</i>) und ABL (<i>Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1</i>)
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
C	Cytosin
CETCs	zirkulierende epitheliale Tumorzellen (<i>circulation epithelial tumor cells</i>)
CMD	Carboxymethyldextran
CML	Chronische myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTCs	zirkulierende Tumorzellen (<i>circulation tumor cells</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleintriphosphat
D-PBS	Dulbecco's Phosphatpuffer (ohne Calcium und Magnesium)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
EpCAM	epitheliales Zelladhäsions/-aktivierungs Molekül (<i>epithelial cell adhesion molecule</i>)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G	Guanin
HER2/neu	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>)
HCT-116	Humane kolorektale Karzinomzelllinie
HT29	Humane kolorektale Adenokarzinomzelllinie
K562	Humane CML-Zelllinie
KRAS	<i>kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>

LSC	Laser Scan-Zytometrie (<i>laser scanning cytometry</i>)
MACS	Magnetisch-aktivierte Zellsortierung (<i>magnetic activated cell sorting</i>)
MDA-MB-231	Humane Mammakarzinomzelllinie
MET	Mesenchymale-epitheliale Transition
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MNP	Magnetische Nanopartikel
NF	Negativfraktion nach der MACS-Separation
NP	Nanopartikel
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PF	Positivfraktion nach der MACS-Separation
PI	Propidiumiodid
PIK3CA	<i>phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha</i>
RPL13A	<i>ribosomal protein L13A</i>
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute, Zellkulturmedium
RPMI-8226	Humane Myelomzelllinie
RT	Raumtemperatur
sc	Einzelzelle (<i>single cell</i>)
T	Thymin
T47D	Humane Mammakarzinomzelllinie
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
WGA	Gesamt-genomische Amplifikation (<i>whole genome amplification</i>)

Zusammenfassung

Der Nachweis sowie die molekulare Charakterisierung disseminierter Tumorzellen ist für die Prognose von Patienten mit soliden Tumoren von großer Bedeutung und wichtiger Forschungsschwerpunkt zahlreicher Studien. Aktuelle Erhebungen des Robert Koch-Institutes zeigen, dass rund ein Viertel aller Todesfälle auf Tumor-assoziierte Erkrankungen zurückzuführen ist. Dabei kann mit über 90 % der größte Teil der tumorbedingten Todesfälle in der Bildung von Metastasen begründet werden. In der Tumorgenese beginnen sich frühzeitig einzelne Zellen vom Primärtumor zu lösen, welche über das vaskuläre System in andere Regionen des Körpers verteilt werden, um sich in entfernten Organen abzusiedeln. Diese zirkulierenden epithelialen Tumorzellen (CETCs, *circulating epithelial tumor cells*) können im peripheren Blut eines Karzinompatienten nachgewiesen werden. Die Bestimmung sowie die Charakterisierung dieser Zellen zeigen vielversprechende Möglichkeiten auf, zukünftig den Behandlungsverlauf eines Patienten zu überwachen, aber auch die Therapie optimal an den Patienten anpassen zu können.

In der vorliegenden Arbeit konnte an einem großen Patientenkollektiv ($n = 390$) die magnetische Anreicherung der CETCs mittels Carboxymethyl-Dextran-umhüllter (CMD-umhüllter) Nanopartikel aussichtsreich durchgeführt werden. Da sich die untersuchten Mammakarzinompatienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme in verschiedenen Therapiesituationen befanden, konnte zum ersten Mal ein therapieabhängiger Anreicherungseffekt nachgewiesen werden. Während für die CETCs der Patienten vor einer operativen Entfernung des Tumors oder in Nachsorge eine sehr gute Interaktion mit den magnetischen Partikeln beobachtet werden konnte, wirkte sich eine Chemotherapie schlecht auf die Anreicherung der tumorverdächtigen Zellen aus. An einer prospektiven Gruppe von Patienten konnte gezeigt werden, dass die CETCs von Patienten während einer Chemotherapie eine verringerte Interaktionsrate aufwiesen als vor Beginn oder nach Abschluss der Behandlung. Durch *in vitro* Inkubationsversuche mit Cyclophosphamid wurde der negative Einfluss des Zytostatikums auf das Wechselwirkungsverhalten der umhüllten Partikel durch die behandelten Zellen experimentell nachgewiesen. Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass sich die magnetische Anreicherungs-methode auch als ein prognostischer Marker für CETCs etablieren könnte. Zusätzlich ermöglicht die deutliche Abtrennung der seltenen Tumorzellen von den Leukozyten weitere molekulare Analysen. Neben der

Erhöhung der Sensitivität können die angereicherten Zellen mittels Genomanalysen spezifischer charakterisiert werden. Hierfür konnte die Untersuchung zum Mutationsstatus auf Einzelzellniveau, sowohl an Zellen der humanen Zellkultur als auch an hämatologischen Zellen, erfolgreich etabliert werden. Für Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom ist bekannt, dass Metastasen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit (mehr als 80 %) die gleichen Mutationen aufweisen wie ihre zugehörigen Primärtumoren. Dies lässt die Annahme zu, dass im Blut dieser Patienten zirkulierende Tumorzellen mit derselben genetischen Alteration vorhanden sein könnten. Aktuelle Untersuchungen einzelner Arbeitsgruppen bestätigen, dass *KRAS*-Mutationen, welche im Primärtumor und in den Metastasen gefunden wurden, ebenfalls in entsprechenden Tumorzellen im Blut detektiert werden konnten. Dass es sich bei den magnetisch angereicherten Zellen wirklich um Tumorzellen zu handeln scheint, konnte an einem Kolonkarzinompatient demonstriert werden. Der im *KRAS*-Gen mutierte kolorektale Karzinompatient zeigte ebenfalls eine genetische Veränderung des untersuchten Genabschnittes für eine der isolierten Einzelzellen aus der Nanopartikel-angereicherten Fraktion. Somit kann die genetische Analyse magnetisch angereicherter CETCs eines Karzinompatienten als erfolgsversprechend bewertet werden. Weitere Untersuchungen wären hier erforderlich, um diesen aussichtsreichen Ansatz zu untermauern.

Bei der Therapie von Tumorerkrankungen ist die Aufklärung der Metastasenbildung von enormer Bedeutung. Derzeit existieren Modelle, welche den Vorgang der Metastasierung beschreiben. Dennoch weisen nur sehr wenige der vom Primärtumor dissoziierten Zellen die Fähigkeit zur unbegrenzten Proliferation und Metastasierung auf. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass aus den Blutproben von Karzinompatienten seltene tumorverdächtige Zellen mittels Dextran-umhüllter Nanopartikel innerhalb von kürzester Zeit angereichert und diese anschließend genetisch charakterisiert werden können. Insgesamt bietet sich eine Weiterentwicklung dieser Methode als ein prognostischer Marker für Nachweisverfahren von CETCs an und kann zu einem besseren Verständnis der Bildung von Metastasen durch zirkulierende epitheliale Tumorzellen beitragen.

Summary

The detection and molecular characterization of disseminated tumor cells may have great prognostic value for patients with solid tumors and is currently the focus of interest in numerous studies. More than 90 % of the tumor-related deaths are caused by the formation of metastases. In tumorigenesis individual cells begin to dissociate from the primary tumor and are distributed through the vascular system to other parts of the body. These circulating epithelial tumor cells (CETCs) can be detected in the peripheral blood of cancer patients. The evaluation and characterization of these cells shows promising possibilities for patient monitoring and could aid the optimization of therapy.

In the present study involving a large cohort (n=390), CETCs were successfully enriched, using magnetic nanoparticles with a carboxymethyl dextran (CMD) shell. When patient samples were evaluated throughout treatment a therapy-dependent enrichment effect was detected for the first time. A very good interaction of CETCs with the magnetic particles was observed for patients prior to surgical removal of the tumor or in follow-up care. Chemotherapy had a negative effect on the magnetic accumulation of the CETCs. In a prospective group of patients it was shown that the CETCs during chemotherapy had a reduced interaction rate compared to samples analyzed prior to and after treatment. By *in vitro* incubation with cyclophosphamide, the negative impact of the cytostatic agent on the interaction of the coated particles with treated cells was demonstrated experimentally. The results suggest that the magnetic enrichment method could be established as a prognostic marker for CETCs. In addition, the clear separation of rare tumor cells from leukocytes allows further molecular study. Apart from increasing the sensitivity the enriched cells can be characterized by specific genomic analysis. For this purpose the evaluation of the mutational status of single cell was successfully established on human cell culture and on patient samples. For patients with metastatic colorectal carcinoma it is known that metastases have the same mutations as their corresponding primary tumors in more than 80% of cases. This leads to the assumption that the same genetic alteration may be present in the CETCs of these patients. Recent studies have confirmed that *KRAS* mutations which were found in the primary tumor and the metastases were also detected in the corresponding tumor cells in the blood. That the magnetically enriched cells are actual tumor cells was demonstrated in a colorectal carcinoma patient. One of the isolated single cells from the nanoparticle-enriched

fraction showed a genetic modification in the *KRAS* gene which was also present in the corresponding tumor. Thus, the genetic analysis of magnetically enriched CETCs in cancer patients shows promising results. Additional studies are needed to support these findings.

The identification of metastases is essential for cancer therapy. Currently, there are models that describe the process of metastasis. However, very few dissociated cells have the ability of unlimited proliferation and metastases. This work demonstrates successfully that the rapid enrichment of circulating tumor cells from blood samples of cancer patients using dextran-enveloped nanoparticles is possible. Additionally subsequent genetic analysis can be carried out to characterize these cells of interest. Generally, this method could be further developed to serve as a prognostic marker. These results could also contribute to a better understanding of the formation of metastases by circulating epithelial tumor cells.

1 Einleitung

1.1 Zirkulierende Tumorzellen als umstrittener Indikator in der Tumorthherapie

Der Nachweis einer Metastasierung ist für die Prognose und die Therapie von soliden Tumoren entscheidend. Wird eine Absiedlung von Zellen eines malignen Primärtumors in anderen Organen nachgewiesen, dann ist eine Tumorerkrankung als systemisch zu betrachten (Scharl und Saltenberg, 2014). Entsprechend muss die lokale Therapie um die Indikation einer systemisch wirksamen Chemotherapie ergänzt werden (Berger et al., 2010). Frühe Stadien metastasierter Tumorerkrankungen können durch die Fortschritte der adjuvanten Therapie und Metastasen Chirurgie in einem kurativen Ansatz therapiert werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2012). Ebenso lassen in der Regel ein Primärtumor in Remission, ein langes erkrankungsfreies Intervall zwischen Auftreten des Primärtumors und Auftreten von Metastasen sowie eine hohe Empfindlichkeit gegenüber einer Chemotherapie oder Strahlentherapie eine kurative Intension im metastasierten Zustand zu (Berger et al., 2010). Hingegen bedingt eine fortgeschrittene Metastasierung einen rein palliativen Therapieansatz mit symptomorientierten Vorgehen. Hierbei bilden die Verzögerung des Fortschreitens der Erkrankung und eine verlängerte Überlebenszeit die Zielvorgabe (Sayer et al., 2008).

Mehr als 90 % der tumorbedingten Todesfälle werden durch die Bildung von Metastasen verursacht und stellen für die Überlebensprognose des Patienten den entscheidenden Faktor dar (Christofori, 2006). Für die erfolgreiche Therapie einer systemisch ausgebreiteten Tumorerkrankung ist daher der frühe, sensitive und spezifische Nachweis von Metastasierung maßgebend. Bereits frühzeitig in der Karzinogenese beginnen sich einzelne Zellen vom Primärtumor zu lösen (CETC, *circulating epithelial tumor cell*), welche die Fähigkeit besitzen Fernmetastasen bilden zu können und somit die Gefahr eines Rezidivs erhöhen (Pantel und Brakenhoff, 2004). In diesem Zusammenhang haben Untersuchungen gezeigt, dass CETCs im Knochenmark sowie im peripheren Blut von Krebspatienten detektiert werden können (Pachmann et al., 2001; Pantel et al., 2003). Dabei wurde für Patienten mit Tumorzellen im Knochenmark eine signifikant schlechtere Prognose nachgewiesen (Koch et al., 2005). Im Jahr 2004 konnte für Patientinnen mit einem metastasierten Mammakarzinom erstmals eine prognostische Relevanz von CETCs aufgezeigt und ein verringertes progressionsfreies sowie

verkürztes Gesamtüberleben belegt werden (Cristofanilli et al., 2004). Die aktuelle Datenlage in der adjuvanten Situation ist noch nicht als gesichert anzusehen, allerdings lassen erste Veröffentlichungen auch hier eine prognostische Bedeutung von CETCs vermuten. Bei adjuvanten Mammakarzinomkrankungen konnte der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen mit einem ungünstigen krankheits- sowie metastasenfreien Überleben, als auch einem verminderten Gesamtüberleben verknüpft werden (SUCCESS-A-Studie; Jäger et al., 2013). Des Weiteren könnten CETCs zukünftig als ein Indikator für den Bedarf systemisch Therapien fungieren (Pantel und Alix-Panabières, 2013). Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass eine präoperative Chemotherapie mit einer deutlichen Verringerung der CETC-Zahl im Blut sowie im Knochenmark von kolorektalen Karzinompatienten einhergeht (Kienle et al., 2003). Darüber hinaus werden zirkulierende Tumorzellen als ein vertrauenswürdiger Parameter der Tumoraktivität vermutet (Panteleakou et al., 2009). So wäre denkbar, dass der persistierende Nachweis von CETCs unter Therapie als Hinweis für die Notwendigkeit einer Therapieumstellung oder Intensivierung dient. Aktuell prüfen verschiedene klinische Studien in der metastasierten Situation (DETECT-III und -IV, SWOG-S0500, TREAT-CTC) eine Therapieentscheidung abhängig vom Nachweis zirkulierender Tumorzellen und deren molekularen Eigenschaften. Die Ergebnisse dieser innovativen Studien werden weiter bedeutende Erkenntnisse über CETCs als prädiktiven Biomarker für eine Therapieintervention liefern und damit das Verständnis für den Prozess der Metastasierung verbessern.

1.2 Maligne Erkrankungen

Aktuelle Statistiken des Robert-Koch-Institutes (RKI) zeigen, dass im Jahr 2010 insgesamt 477.300 Menschen in Deutschland neu an Krebs erkrankten. Das sind etwa 7.500 Patienten mehr als im Jahr 2008. Für das Jahr 2014 wird die Zahl der Neuerkrankungen auf rund 500.000 geschätzt. Damit steigt zwar die Rate der Neuerkrankungen weiterhin leicht an, allerdings kann heute mehr als die Hälfte der Betroffenen durch Fortschritte in der Therapie auf eine dauerhafte Heilung hoffen. Bei der weiblichen Bevölkerung stellt das Mammakarzinom die häufigste Tumor-assoziierte Neuerkrankung dar (70.340 Fälle jährlich) und führt mit 17.466 Fällen die Krebssterbefälle an. Vergleichsweise steht bei den Männern das Karzinom der Prostata (65.830 Fälle) an erster Stelle bei den Krebsneuerkrankungen, während Bronchialkarzinome (29.381 Fälle) bei der Todesursachenstatistik führen (Krebs in Deutschland 2009/2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen zur magnetbasierten Anreicherung von zirkulierenden Tumorzellen am Mammakarzinom durchgeführt, da hierfür bereits Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe existierten. Diese verdeutlichten, dass eine quantitative Entfernung der zirkulierenden Tumorzellen aus dem peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen möglich ist (Schwalbe et al., 2006b). Eine genetische Charakterisierung der magnetisch angereicherten Zellen erfolgte an Proben kolorektaler Karzinompatienten. Aufgrund einer therapierelevanten Mutation im Onkogen *KRAS* (*kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) kommt es zu einer Daueraktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade, weshalb der Mutationsstatus des Gens im Primärtumor vor Therapiebeginn ermittelt wird und für nachfolgende Untersuchungen bekannt ist. Darüber hinaus treten die beiden untersuchten malignen Erkrankungen häufig auf und sind somit Vertreter für viele solide Tumoren.

1.2.1 Mammakarzinome

Das Mammakarzinom ist mit Abstand die am meisten verbreitete Tumorentität und gleichzeitig auch die tumorbedingt häufigste Todesursache bei Frauen in Deutschland. Mit 64 Jahren liegt das mittlere Erkrankungsalter bei Frauen niedriger als bei Männern (69 Jahre, zuletzt jährlich 610 Fälle), wobei zunehmend auch jüngere Frauen betroffen sind. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Patientinnen mit Mammakarzinom liegt derzeit zwischen 86 % bis 88 %, für Männer zwischen 51 % bis 88 % (Krebs in Deutschland 2009/2010). Als statistische Risiken für die Entstehung eines Malignoms der Brustdrüse werden Faktoren wie Kinderlosigkeit oder eine späte Erstschwangerschaft ebenso diskutiert, wie eine genetische Prädisposition oder benigne Vorerkrankungen der Mamma. Darüber hinaus sind typische Risikofaktoren wie Umwelteinflüsse, Übergewicht und Lebensstil mit einem erhöhten Erkrankungspotenzial für gynäkologische Tumoren assoziiert. Dabei nimmt die Gefahr, an einem Mammakarzinom zu erkranken, mit Häufung der genannten Faktoren zu (Strauss et al., 2009).

Mammakarzinome können in Abhängigkeit definierter histologischer Parameter und Wachstumsmuster eingeteilt werden. Als Vorstufen einer malignen Erkrankung grenzen sich Präkanzerosen durch eine intakte Basalmembran ab. Dazu zählt das lobuläre Karzinom in situ (LCIS) wie auch das duktales Karzinom in situ (DCIS), welche das Progressionspotential zu einem invasiven Karzinom besitzen (Cowell et al., 2013). Dabei beschreiben die Attribute

„lobulär“ (Brustdrüsenläppchen) und „duktal“ (Brustdrüsengänge) den anatomischen Ort der Epithelveränderung. Das invasive duktile Karzinom ist mit 60 % bis 80 % die häufigste Form des Mammakarzinoms, gefolgt vom lobulären Karzinom (10 %). Daneben werden weitere Subtypen wie das papilläre, muzinöse oder tubuläre Karzinome differenziert (Mallon et al., 2000). Für die klinischen Untersuchungen steht eine Vielzahl an diagnostischen Methoden zur Verfügung, welche in Kombination mit histologischen Befunden zu großen Fortschritten in der Therapie des primären Mammakarzinoms führten. Etablierte klinisch-pathologische Faktoren wie die Tumorgröße, der Lymphknotenstatus, das Vorliegen von Fernmetastasen, das Grading, der Hormonrezeptorstatus sowie das Alter erlauben eine Abschätzung des Krankheitsverlaufes. Einige der aufgeführten Prognosefaktoren finden bei der Klassifikation von malignen Tumoren im TMN-System der UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) Verwendung und bestimmen häufig den weiteren Therapieverlauf. Über die letzten Jahre hat sich ein Wandel bei den Grundlagen zur Therapieentscheidung von histomorphologischen Eigenschaften zu tumorbiologischen Kriterien vollzogen. Inzwischen wurden die immunhistochemischen Bestimmungen des Hormonrezeptor- und des HER2-Status (*human epidermal growth factor receptor 2*) als Surrogatparameter akzeptiert (Harbeck et al., 2012). Durch minimalinvasive diagnostische Methoden, wie der Feinnadelbiopsie, kann der Zustand des Östrogen- (ER) und Progesteronrezeptors (PR) bereits prätherapeutisch bestimmt werden. Dabei lässt der ermittelte Wert eine Aussage über die damit verbundene Hormonsensitivität zu. Je höher der Rezeptorstatus ist, desto besser ist das Ansprechen des Tumors auf eine Hormontherapie und damit auch die Prognose für die Patientin. Im Gegensatz dazu besteht eine positive Korrelation zwischen dem Nachweis eines tripelnegativen Karzinoms (ER, PR und HER2 negativ; 15 % bis 20 % der Mammakarzinome) mit einer ungünstigen Prognose, welche mit einem deutlich kürzeren Gesamtüberleben assoziiert sind (Harbeck und Sotlar, 2014). Diese Patientinnen werden in die Gruppe der Hochrisikopatient eingestuft (Berger et al., 2010). Aufgrund des Fehlens einer therapeutisch nutzbaren Zielstruktur ist die Therapie der Wahl in der metastasierten sowie adjuvanten Situation eine Chemotherapie (Goldhirsch et al., 2013).

1.2.1.1 Therapierichtlinien des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom gilt als eine systemische Erkrankung und erfordert ein multimodales und interdisziplinäres Behandlungskonzept. Dabei wird das therapeutische Vorgehen entsprechend der histologischen und TNM-Stadieneinteilung gewählt. Bei den

Behandlungsmöglichkeiten kann zwischen den chirurgischen, medikamentösen und strahlentherapeutischen Formen unterschieden werden, welche einen kurativen oder palliativen Therapieansatz erlauben. Im Rahmen einer alle zwei Jahre stattfindenden Internationalen Konsensuskonferenz (St. Gallen) werden allgemeine Therapieempfehlungen erarbeitet. Für Deutschland werden jährlich evidenzbasierte Leitlinien von der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) der deutschen Krebsgesellschaft erstellt.

Das primäre Ziel der adjuvanten Systemtherapie liegt darin, eine Heilung zu erzielen und das Rezidivrisiko zu senken. Hierbei sollen bereits frühzeitig disseminierte Tumorzellen in ihrem Wachstum gehemmt und eliminiert werden, womit eine Bildung von Metastasen verhindert werden soll (Schmid und Possinger, 2002; Eucker et al., 2006; Leitlinienprogramm Onkologie, 2012). Daher rechtfertigt das kurative Behandlungsverfahren eine kombinierte und intensive Therapie. Nach Standardleitlinie erfolgte im nicht metastasierten Zustand anschließend an die kurativ operative Entfernung des Primärtumors die Indikationsstellung zur adjuvanten Therapie (Leitlinienprogramm Onkologie, 2012). Heutzutage wird immer häufiger die systemische Therapie bereits vor der Operation durchgeführt (neoadjuvante Therapie; Scharl und Salterberg, 2014). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine solche primär systemische Therapie der einer klassisch postoperativen (adjuvanten) Chemotherapie onkologisch gleichwertig ist und eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens sowie des Gesamtüberlebens erzielt wird (Berger et al., 2010; Berruti et al., 2011). Eine neoadjuvante Therapie bietet zudem die Möglichkeit, das Ansprechen des Tumors auf die Chemotherapie in vivo verfolgen und das Tumolvolumen vermindern zu können, womit die Zahl an brusterhaltenden Behandlungen vergrößert werden kann. Eine strahlentherapeutische Therapie findet in der Regel nach der Operation und Chemotherapie statt (Scharl und Salterberg, 2014). Während die Radiotherapie bei einer Mastektomie nur empfohlen wird, ist eine Bestrahlung bei einer brusterhaltenden Tumorresektion obligat, um das Risiko eines Lokalrezidivs zu minimieren (Ataseven et al., 2010). Die Systemtherapie besteht je nach Expression der Hormonrezeptoren aus einer endokrinen Therapie und/ oder einer Chemotherapie (Tab. 1). Dabei werden oft Cyclophosphamid und anthrazyklin- sowie taxanhaltige Substanzen eingesetzt, seltener Fluorouracil (Scharl und Salterberg, 2014). Der Beginn einer endokrinen Therapie erfolgt dabei nach Abschluss der Chemotherapie und ist abhängig davon, ob diese prä- oder postmenopausal angewendet wird (Berger et al., 2010).

Tab. 1 Die wichtigsten Medikamente beim Mammakarzinom (modifiziert nach Kaufmann et al., 2002).

Arzneistoffgruppe	Wirkmechanismus	Einsatzform
A. Chemotherapie		
<u>Alkylierende Substanzen</u> z.B. Cyclophosphamid	Durch chemische Veränderung der DNA wird die Zellteilung in allen Phasen gestört.	<i>für alle Therapien mit Zytostatika:</i> <ul style="list-style-type: none">• adjuvant: bei erhöhtem Rückfall- oder Ausbreitungsrisiko• bei Metastasen oder fortgeschrittener Erkrankung
<u>Antimetaboliten</u> z.B. 5-Fluorouracil	Greift den Zellstoffwechsel und damit auch die Zellteilung an.	
<u>Anthrazykline</u> z.B. Doxorubicin und Epirubicin	Es handelt sich um Antibiotika mit starker zellwachstumshemmender Wirkung.	
<u>Taxane</u> z.B. Docetaxel und Paclitaxel	Greifen die Mikrotubuli an, welche während der Zellteilung für die richtige Anordnung der Chromosomen sorgen.	
B. Endokrine Therapie		
<u>Antiöstrogene</u> z.B. Tamoxifen	Besetzt die Östrogenrezeptoren der Tumorzellen und vermindert so die Wirkung von Wachstumsfaktoren.	<ul style="list-style-type: none">• adjuvant: bei erhöhtem Rückfall- oder Ausbreitungsrisiko vor und nach den Wechseljahren• bei Metastasen oder fortgeschrittener Erkrankung
<u>Aromatasehemmer</u> z.B. Anastrozol	Greifen in die Östrogenbildung in den Nebennieren sowie im Fett- und Muskelgewebe ein und hemmen das Wachstum der Krebszellen.	<ul style="list-style-type: none">• adjuvant: bei erhöhtem Rückfall- oder Ausbreitungsrisiko nach den Wechseljahren• bei Metastasen oder fortgeschrittener Erkrankung vor und nach den Wechseljahren
<u>GnRH-Analoga</u> z.B. Goserelin	Östrogenproduktion in den Eierstöcken wird über einen Angriffspunkt in der Hirnanhangdrüse blockiert.	<ul style="list-style-type: none">• adjuvant: bei erhöhtem Rückfall- oder Ausbreitungsrisiko vor den Wechseljahren• bei Metastasen oder fortgeschrittener Erkrankung
C. Zielgerichtete Therapie		
<u>Monoklonale Antikörper</u> z.B. Bevacizumab	Hemmt die Angiogenese durch zielgerichtete Bindung an den Wachstumsfaktor VEGF.	<ul style="list-style-type: none">• bei fortgeschrittener Erkrankung und Metastasen• nur als Zweitlinientherapie
z.B. Trastuzumab	Hemmt das Krebswachstum durch Blockade der Bindungsstellen für Wachstumsfaktoren am HER2/neu-Rezeptor.	<ul style="list-style-type: none">• bei fortgeschrittener Erkrankung und Metastasen• bei HER2/neu-Nachweis
<u>Tyrosinkinase-Inhibitoren</u> z.B. Lapatinib	Hemmt die Übertragung von Wachstumssignalen durch Blockade der Tyrosinkinasedomäne des EGFR/HER2-Rezeptors.	<ul style="list-style-type: none">• bei fortgeschrittener Erkrankung und Metastasen• bei HER2/neu-Nachweis

(EGFR - epidermal growth factor receptor, GnRH – gonadotropin releasing hormone, HER2/neu - human epidermal growth factor receptor 2, VEGF - vascular endothelial growth factor)

Als zusätzliche adjuvante Methode zur Tumorbekämpfung haben sich zielgerichtete Therapien (*targeted therapies*) mit monoklonalen Antikörpern oder kleinen Molekülen

etabliert, welche direkt auf die spezifischen molekularen Eigenschaften des Tumors zielen. Für Patientinnen mit HER2-überexprimierenden Karzinomen besteht häufig eine Resistenz gegenüber endokriner Therapien (Ditsch et al., 2006). Der zusätzliche Einsatz von Trastuzumab bei einer HER2-Überexpression, im Anschluss an eine anthrazyklinhaltige Therapie oder parallel zur Taxantherapie, verlängert das progressionsfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben (Berger et al., 2010; Yin et al., 2011).

Bei 5 % der Patientinnen mit einem Mammakarzinom wird mit der Primärdiagnose eine Metastasierung festgestellt. Im Gegensatz dazu wird bei der überwiegenden Mehrzahl der Patientinnen die Diagnose von Metastasen im Krankheitsverlauf gestellt (Sayer et al., 2008). Dabei sind knapp drei Viertel der Rezidive Fernmetastasen, wobei eine ossäre Absiedlung am häufigsten vorkommt. Die Intention bei der Behandlung in der metastasierten Situation liegt in der Regel in der Lebensverlängerung und Erhaltung der Lebensqualität. Daher kommen in der palliativen Therapie insgesamt weniger aggressive Behandlungsverfahren zum Einsatz. Der wichtigste und dadurch die Therapie bestimmende Faktor ist die Dynamik der Erkrankung (Berger et al., 2010). Nach der St.-Gallen-Empfehlung von 2011 erfolgt die Indikationsstellung zur Systemtherapie aufgrund der molekularen Tumorsubtypen sowie einer Einstufung bezüglich des Rezidivrisikos. Während bei Patienten mit einer günstigen Prognose, aufgrund des Nachweises einer Hormonrezeptorpositivität und einem langen krankheitsfreien Intervall sowie metastasefreien Organen, stets eine endokrine Therapie allein erfolgen kann, muss bei einem erhöhtem Rezidivrisiko der Nutzen einer Kombination aus endokriner und Chemotherapie abgewogen werden (Leitlinienprogramm Onkologie, 2012). Allerdings sollte bei einem Patienten mit rascher Progredienz und hormonrezeptornegativem Tumor sowie vorliegenden Organmetastasen immer eine Chemotherapie durchgeführt werden (Berger et al., 2010).

1.2.2 Kolorektale Karzinome

In Deutschland betrifft jede siebte Krebserkrankung den Darm. In mehr als 95 % der Fälle handelt es sich bei einem malignen Darmtumor um ein kolorektales Karzinom. Nach aktuellen Untersuchungen des RKI erkrankten im Jahr 2010 rund 33.800 Männer und etwa 28.620 Frauen, wodurch der Darm die dritt- bzw. zweithäufigste Tumorlokalisation der Krebsneuerkrankungen darstellt. Auch bei den krebsbedingten Sterbefällen liegt das Kolonkarzinom auf den vorderen Positionen. Nahezu zwei Drittel der Erkrankungen betreffen

den Dickdarm, etwa 30 % treten im Enddarm auf und die übrigen Erkrankungen verteilen sich auf den Übergang zwischen Dick- und Enddarm bzw. Analkanal. Histologisch gesehen handelt es sich bei malignen Kolonkarzinomen fast ausschließlich um Adenokarzinome (85 %). Den bedeutend kleineren Anteil machen Plattenepithelkarzinome im Analbereich und neuroendokrine Tumoren aus. Mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 57 % bis 68 % für beide Geschlechter gehört das kolorektale Karzinom zu den Krebserkrankungen mit einer mittleren Prognose (Krebs in Deutschland 2009/2010). Neben Übergewicht zählen Bewegungsmangel sowie eine ballaststoffarme, fettreiche Fehlernährung mit hohem Anteil an rotem Fleisch ebenso zu den statistischen Risikofaktoren, wie regelmäßiger Alkohol- und Tabakkonsum. Darüber hinaus ist das kolorektale Karzinom ein Tumor des höheren Lebensalters, wobei mit fortschreitendem Alter das Risiko einer malignen Neuerkrankung exponentiell ansteigt (Arnold, 2013). Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 71 Jahren und für Frauen bei 75 Jahren (Krebs in Deutschland 2009/2010). Des Weiteren wird die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms durch eine Vielzahl von Genen und Genmutationen beeinflusst. Für etwa 20 % bis 25 % der kolorektalen Karzinome kann eine familiäre Prädisposition mit der Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden (de la Chapelle, 2004). In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle allerdings entstehen kolorektale Karzinome durch neu erworbene Genmutationen, welche zu 50 % bis 70 % in der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz entstehen (Tischoff und Tannapfel, 2013). Hierbei kommt es zu einer Mutation oder einem Genverlust in Tumorsuppressorgenen oder Protoonkogenen, wobei diese in keiner festgelegten Reihenfolge beteiligt sind (Abb. 1). Molekulargenetisch treten genetische Veränderung des Tumorsuppressorgens *APC* (*adenomatous polyposis coli*) und des Onkogens *KRAS* (*kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) im Verlauf der Tumorgenese meist frühzeitig auf, Mutationen in *p53* eher später (Sancho et al., 2005).

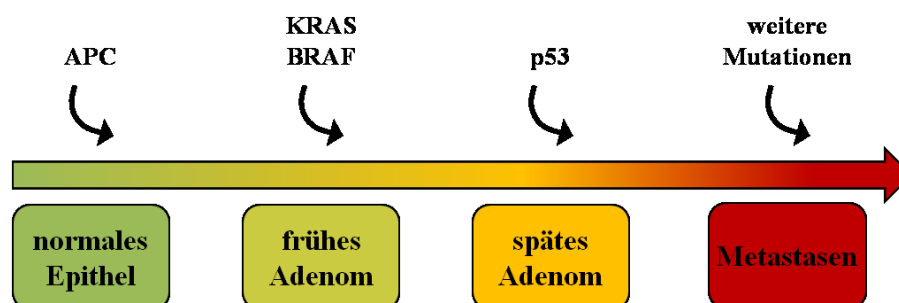


Abb. 1 Die Adenom-Karzinom-Sequenz.

Beschrieben wird die schrittweise Ansammlung von Mutationen in Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen, wodurch die Tumorinitiation und -progression bis zum Stadium des malignen Karzinoms verursacht wird (*APC* - *adenomatous polyposis coli*, *BRAF* - *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*, *KRAS* - *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; modifiziert nach Sancho et al., 2005, Fearon und Vogelstein, 1990).

Am Beispiel des *KRAS*-Gens kann der bedeutende Einfluss einer vorliegenden Mutation auf die richtige Wahl der molekularbiologischen Therapieoption verdeutlicht werden. In etwa 40 % der nicht-familiär bedingten kolorektalen Karzinome werden onkogene *KRAS*-Mutationen beschrieben (Finkelstein et al., 1993). Bei einer vorliegenden *KRAS*-Genveränderung kann der Patient aufgrund einer Resistenzbildung nicht von der Wirksamkeit einer Behandlung mit einem EGFR-Antikörper (Epidermal Growth Factor Receptor) profitieren (Stintzing et al., 2009). Daher muss bei einer Anti-EGFR-Therapie der molekularpathologische Nachweis einer *KRAS*-Mutation ausgeschlossen werden. Darüber hinaus verdeutlichten Studiendaten im vergangenen Jahr, dass für eine verbesserte Stratifizierung der Patienten keine aktivierende *NRAS*-Mutationen nachgewiesen werden dürfen (Dietel et al., 2014). Die Beobachtung, dass die Rate der *KRAS*-Tests vor Therapiebeginn von drei Prozent im Jahr 2008 auf 69 % im Jahr 2010 stieg (Leiner, 2014), veranschaulichen, dass der Gentest mittlerweile einen entscheidenden diagnostischen Marker darstellt. Für Patienten nicht-mutierter Tumoren können für zielgerichtete Substanzen, wie Cetuximab und Panitumumab, in Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika hohe Ansprechraten erreicht und das Gesamt- sowie progressionsfreie Überleben verlängert werden (Dietel et al., 2014). Generell konnten, durch die Entwicklung von Antikörpern, neue wirksame therapeutische Möglichkeiten für die Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms aufgezeigt werden. Zukünftig können diese Fortschritte und die ständige Weiterentwicklung der Krebstherapie die Heilungschancen der Patienten verbessern.

1.2.2.1 Therapierichtlinien des Kolonkarzinoms

Das kolorektale Karzinom zählt zu den wenigen malignen Erkrankungen, deren Auftreten durch Früherkennung wirkungsvoll verhindert werden kann. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist stark abhängig vom Tumorstadium. Während eine Überlebenschance von 90 % bis 95 % für Patienten ohne Lymphknotenbefall sowie ohne Fernmetastasen (UICC Stadium I-II) besteht, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit Nachweis einer Metastasierung (UICC Stadium IV) bei weniger als 10 % (Berger et al., 2010). Daher kommt den Präventionsmaßnahmen eine besondere Bedeutung zu. Die Koloskopie gilt als Goldstandard der strukturellen Untersuchung und zeichnet sich durch eine deutliche Reduktion bezüglich der Inzidenz sowie Mortalität aus (Arnold, 2013; Jemal et al., 2011). Konnte die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms nicht verhindert werden, erfolgt vor der Resektion des Primärtumors die Klassifikation im TMN-System, welche den weiteren Therapieverlauf

bestimmt. Für Patienten mit einem kolorektalen Karzinoms im Stadium I und II ist eine postoperative adjuvante Chemotherapie nicht erforderlich (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Die Heilungschancen der Patienten liegen bei 50 % (Berger et al., 2010). Der Einsatz einer adjuvanten Chemotherapie zur Senkung der Rezidivrate und zur Verbesserung der Überlebensrate ist indiziert, wenn lymphoge Metastasen und/ oder eine Fernmetastasierung nachgewiesen werden kann (Stadium III-IV; Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Dabei sollte die adjuvante Therapie so früh wie möglich nach der Operation begonnen werden, da ein Verzug mit einem gesteigerten Risiko, an der Erkrankung zu versterben, verknüpft ist (Biagi et al., 2011). Trotz des Nachweises einer Metastasierung ist eine kurative Intention möglich. Voraussetzung hierfür ist allerdings die komplette (R0-) Resektion von Leber- und Lungenmetastasen (Berger et al., 2010). Ist die Entfernung des metastasierten Tumorgewebes nicht vollständig durchführbar, dann ist eine anschließende Chemotherapie nur palliativ wirksam. Dennoch kann dadurch eine Verbesserung des Gesamtüberlebens und der Lebensqualität erzielt werden. Bei einer primären Irresektabilität sollte die Durchführung einer präoperativen Chemotherapie erfolgen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2013). Kann trotz einer neoadjuvanten Therapie der Tumor nicht im Ganzen entfernt werden, dann ist lediglich eine palliative Chemotherapie möglich.

Bei der Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms greifen multimodale Therapiekonzepte, welche neben der klassischen Chemotherapie zunehmend auch monoklonale Antikörper und „*targeted therapies*“ enthalten (Berger et al., 2010). Der Einsatz dieser zielgerichteten Substanzen, die beispielsweise die Angiogeneose hemmen oder spezifische Wachstumsfaktoren bzw. deren Rezeptor blockieren, ist allerdings nur dann gerechtfertigt, wenn keine aktivierenden Mutationen im Tumorgewebe vorliegen (Dietel et al., 2014). Darüber hinaus zeigt die Selektive Interne Radiotherapie (SIRT) erfolversprechende Ergebnisse bei nicht resektablen Lebermetastasen (Berger et al., 2010).

1.3 Metastasierung

Das fundierte Wissen über die zugrundeliegenden Pathomechanismen der Metastasierung ist noch nicht vollständig gesichert. Zwar existieren Modelle, welche den Vorgang der Metastasierung beschreiben, jedoch sind die molekularen Ursachen für Zeitpunkt und Auslöser der Metastasierung, als auch die unterschiedlichen Metastasierungshäufigkeiten der verschiedenen Tumorentitäten nur unzureichend verstanden. Schon in Frühstadien der Tumorgenese beginnen sich Zellen vom Primärtumor zu lösen, welche über das vaskuläre

System in andere Regionen des Körpers verteilt werden und sich in entfernten Organen absiedeln. Bei den Abläufen wird zwischen lymphogener und hämatogener Metastasierung unterschieden. Vorrangig verläuft die Metastasierung zu entfernten Organen, wie beispielsweise in die Leber, über den hämatogenen Weg (Pantel et al., 2008; Abb. 2). Die Ausbildung von Fernmetastasen über Lymphbahnen stellt dennoch einen wichtigen Indikator für das Progressionsstadium des Tumors dar (Weinberg, 2007).

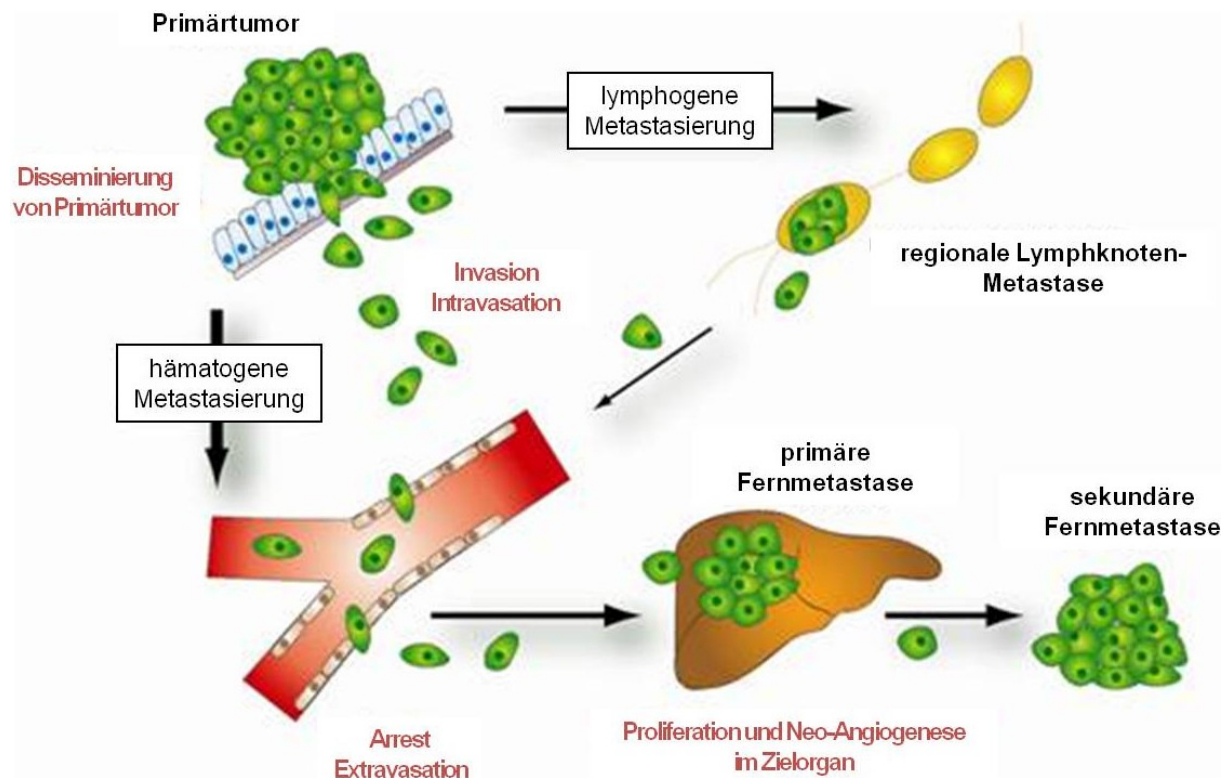


Abb. 2 Schematische Darstellung der Fernmetastasierung von soliden Tumoren.

Die vom Primärtumor disseminierten Tumorzellen invadieren über den hämatogenen oder lymphogenen Weg in die Blutgefäße und gelangen über den Blutkreislauf zu entfernt liegenden Organen. Durch Proliferation und Neo-Angiogenese werden Fernmetastasen gebildet (modifiziert nach Pantel und Brakenhoff, 2004 sowie Steeg, 2006).

Durchschnittlich weisen 30 % aller Patienten mit einer neu diagnostizierten Neoplasie Metastasen auf. Bei mindestens 30 % der verbleibenden Patienten muss von einer okkulten Metastasierung ausgegangen werden, da Mikrometastasen klinisch nicht fassbar und mit bildgebenden Verfahren nicht nachgewiesen werden können (Kath und Höffken, 1998; Berger et al., 2010). Die Untersuchungen zum Ort der Metastasierung verdeutlichen, dass es sich bei der Metastasierung um einen gerichteten Prozess handeln muss. In 75% der Fälle zeigen Kolonkarzinompatienten eine hepatische Metastasierung, zu 15% eine pulmonale Absiedlung und zu jeweils 5% Gehirn- oder Knochenmetastasen (Kallinowski und Schmidt, 1999). Für

Patienten des Mammakarzinoms sind ebenfalls Skelett, Leber und Lunge die häufigsten Lokalisationen für Fernmetastasen (Weinberg, 2007). Diese Organspezifität weist darauf hin, dass die Metastasierung selektiven Mechanismen unterliegt und der Prozess zielgerichtet abläuft. Bereits 1889 formulierte Paget die „*seed and soil*“-Theorie, welche besagt, dass nicht allein die Dissemination von Tumorzellen („*seed*“) für eine Bildung von Metastasen nötig ist, sondern diese ebenso von einem geeigneten Mikromilieu („*soil*“) abhängt (Paget, 1889). Die Metastasierung allein durch den Arrest der disseminierten Tumorzellen in den feinen Kapillaren des Gefäßsystems innerhalb der Organe stellte Ewing 1928 als gegensätzliches Modell vor (Fidler, 2003). Heute wird von einer Verknüpfung der beiden Prozesse ausgegangen. Sowohl die Anatomie des vaskulären Systems, als auch die Absiedlung der Tumorzellen durch die vorherrschende Mikroumgebung im Organ werden als Bedingungen für die organspezifische Metastasierung angenommen (Chambers et al., 2002; Fidler, 2003). Gegenstand der derzeitigen Forschung sind genaue Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen, welche dem Metastasierungsprozess zugrunde liegen. Es besteht die Vermutung, dass die metastatische Fähigkeit einer Zelle schon in einem frühen Stadium der Tumorprogression bestimmt wird (Van't Veer und Weigelt, 2003). Beispielsweise konnte für metastasierte Mammakarzinomzellen ein ähnliches Expressionsmuster wie für den Primärtumor nachgewiesen werden (Van't Veer et al, 2002). Auch die Akkumulation von Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Proto-Onkogenen, welche zur Initiation und Progression von Tumoren führen sollen, werden diskutiert. Bereits schon 1993 beschrieb Vogelstein, dass jede Mutation eine Reihe von zellulären Ereignissen antreibt, welche einen Einfluss auf Tumorgröße, Desorganisation und Malignität haben. Dabei scheinen bereits drei bis sechs unabhängig transformierende Ereignisse für eine Progression von einer gesunden Epithelzelle zum metastasierten Karzinom ausreichend zu sein (Vogelstein und Kinzler, 1993). Dieser schrittweise Prozess der Anhäufung von Mutationen stellt ein Indiz für das stark ansteigende Erkrankungsrisiko im Alter dar. Problematisch ist, dass sich entstehende Metastasen häufig deutlich vom Primärtumor in ihrer Differenzierung und Aggressivität unterscheiden (Harouaka et al., 2014). Mit der Akkumulation der Veränderungen im Genom steigt somit auch die Gefahr der Resistenzentwicklung der Metastasen gegenüber primär angewandten Therapiestrategien.

In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die Metastasierung ein äußerst ineffizienter Prozess ist. Lediglich 0,01 % der vom Primärtumor disseminierten Zellen erfüllen die für die Metastasierung notwendigen Voraussetzungen (Weiss, 1990; Kath und

Höffken, 1998). Damit weisen nur sehr wenige Zellen die Kapazität zur unbegrenzten Proliferation auf. Darüber hinaus ist bekannt, dass es sich bei einem Tumorgewebe nicht um eine einheitliche Zellmasse handelt. Vielmehr besteht der Tumor aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Tumorzellen (Meacham und Morrison, 2013). Daher wird für die vollständige Aufklärung des Metastasierungsprozesses eine genaue Untersuchung der zirkulierenden Tumorzellen ausschlaggebend sein. In mehr als 14.000 Publikationen wurde über die entscheidende Rolle dieser Zellen, als die Transportform einer malignen Erkrankung im Verlauf der Metastasierung, diskutiert (Pantel und Alix-Panabières, 2013).

1.4 Zirkulierende Tumorzellen

Bereits im Jahr 1869 wurde das Vorhandensein von Tumorzellen in der peripheren Zirkulation eines metastasierten Patienten nachgewiesen (Ashworth, 1869). Seitdem wird in der Forschung über die klinische Relevanz dieser Zellen diskutiert. In mehr als 400 klinischen Studien wurden die zirkulierenden Zellen als möglicher Biomarker eingeschlossen, womit die Detektion und Charakterisierung dieser Zellen den aktivsten Bereich der translationalen Krebsforschung darstellen (Alix-Panabières und Pantel, 2013). Bei den zirkulierenden Tumorzellen handelt es sich um Zellen epithelialer Herkunft (CETC, *circulating epithelial tumor cell*), welche in einer Frequenz von 10^{-3} bis 10^{-7} zwischen den gesunden hämatogenen Zellen im Blut zu finden sind (Pachmann et al., 2001). Auch noch Jahre nach der Entfernung des Primärtumors können CETCs im peripheren Blut von Mammakarzinompatientinnen nachgewiesen werden (Pachmann, 2005a; Pantel und Alix-Panabières, 2013). Dabei befindet sich der überwiegende Teil dieser Zellen in einem mitotisch nicht-aktiven Zustand (G0-Phase) und könnten sich dadurch der apoptotischen Wirkung angewandter Therapien entziehen (Pantel et al., 1997). Die Aufklärung der Ursache für diese teilweise langanhaltende Dormanz der Tumorzellen ist bisher noch nicht gelungen. Es existieren Hinweise, dass das Knochenmark wegen seiner geeigneten Milieueigenschaften als eine Art Reservoir für Tumorzellen fungiert und maligne Zellen so in die Rezirkulation gebracht werden können (Pantel et al., 2008). Hierbei scheinen zirkulierende Tumorzellen die Fähigkeit zu besitzen, sich phänotypischen Veränderungen zu unterziehen, wie beispielsweise bei der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT; Gorges und Pantel, 2013). Dies ermöglicht den Tumorzellen an den Ort der Metastasenbildung zu gelangen, ohne dabei durch konventionelle Behandlungsmethoden beeinträchtigt zu werden. Für einen Teil dieser Zellen konnten EMT- und Tumor-Stammzell-Charakteristika nachgewiesen werden (Aktas et al., 2009). Im Zusammenhang mit Tumorstammzellen wird eine Resistenz gegenüber der Strahlen- und

Chemotherapie beschrieben (Diehn und Clarke, 2006; Nicolini et al., 2010), wodurch die Wirksamkeit einer Therapie von der erfolgreichen Eliminierung dieser Zellen abzuhängen scheint (Fehm et al., 2012; Shigdar et al., 2014). Zudem existieren wissenschaftliche Ergebnisse, dass der EMT-Prozess an einem Anstieg der Disseminierung einzelner Tumorzellen vom Primärtumor beteiligt ist. Es wird angenommen, dass der Übergang einer Epithelzelle in eine Zelle mit mesenchymalen und dadurch migrationsfähigen Eigenschaften im Ablauf der malignen Dedifferenzierung involviert ist (Thiery, 2002; Abb. 3). An präklinischen Modellen konnte bereits erfolgreich eine aberrante EMT-Aktivierung mit der Tumormetastasierung in Verbindung gebracht werden (Thiery, 2002; Kalluri und Weinberg, 2009). Auch bei der Verbreitung der zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut von Mammakarzinompatienten konnte eine EMT-Beteiligung nachgewiesen werden (Yu et al., 2013). Allerdings unterlaufen auch einige der epithelialen Zellen den EMT-Vorgang und treten über passive Prozesse in den Blutstrom ein (Friedl und Alexander, 2011).

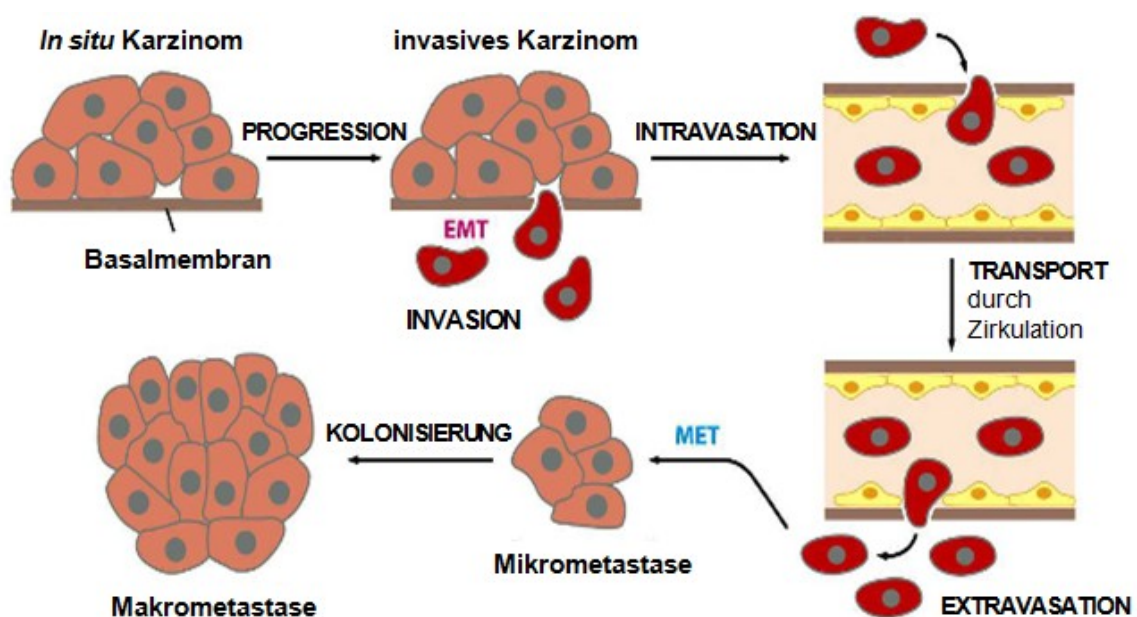


Abb. 3 Die Beteiligung von EMT und MET bei der Metastasierung.

Phänotypische Veränderung, wie Epithelial-mesenchymale Transition (EMT), ermöglichen den Tumorzellen die Basalmembran zu durchwandern und in das lymphatische oder Blutsystem zu invadieren. Durch die Zirkulation erfolgt der passive Transport der malignen Zellen zu entfernten Organen. Einzelne Tumorzellen gelangen nach der Extravasation in das umliegende Gewebe und erlangen durch die Mesenchymal-epitheliale Transition (MET) wieder epitheliale Eigenschaften und bilden Fernmetastasen (modifiziert nach Weinberg, 2007).

Über die Rolle des reversen biologischen EMT-Prozesses, der Mesenchymal-epithelialen Transition (MET), ist im Krebsgeschehen nur sehr wenig bekannt. Es wird angenommen, dass MET bei der Bildung von Fernmetastasen beteiligt ist, indem zirkulierende Tumorzellen wieder epitheliale Eigenschaften erlangen und sich diese somit in entfernten Organen

integrieren können (Yang und Weinberg, 2008). In den letzten Jahren haben Forscher begonnen, den MET-Vorgang als ein mögliches therapeutisches Ziel bei der Prävention von Metastasen zu untersuchen.

Die Fertigkeit, CETC im peripheren Blut von Karzinompatienten nachweisen zu können, birgt große Versprechungen (Alix-Panabières und Pantel, 2013). Cristofanilli und Kollegen ist es 2004 gelungen die prognostisch Relevanz von CETCs bei Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom nachzuweisen (Cristofanilli et al., 2004). Darüber hinaus konnte in einer großen Metaanalyse über 49 Studien zwischen 1990 und 2012 der prognostische Wert von CETCs in der metastasierten Situation als auch in der Adjuvanz signifikant bestätigt werden (Zhang et al., 2012). Nach einer Standardisierung des CETC-Detektion könnte das Verfahren bei Therapieentscheidungen helfen und die Patientenversorgung ergänzen. Aktuell wird geprüft, ob eine Therapieintervention auch bei anderen Tumorentitäten aufgrund des Nachweises von CETCs die Behandlung und damit die Prognose des Patienten verbessern kann. Des Weiteren könnte zukünftig die molekulare Charakterisierung der CETCs einen prädiktiven Marker für den Therapieerfolg darstellen (Thalgott et al., 2014). Persistierende isolierende Tumorzellen gelten als Surrogatmarker der minimalen Tumorerkrankung und sind mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Fehm et al., 2012). Damit stellen sie ein ideales Ziel für künftige Therapieansätze dar. Dementsprechend ist nicht nur der Nachweis von CETCs, sondern auch deren Charakterisierung von großer Bedeutung und wichtiger Forschungsschwerpunkt zahlreicher Studien.

1.5 Quantifizierung und Genotypisierung zirkulierender Tumorzellen

Dank moderner Technologien ist eine Detektion und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen bei soliden epithelialen Tumoren, im Knochenmark sowie im Blut, möglich (Jäger et al., 2013; Alix-Panabières und Pantel, 2013). Ein Zusammenhang, zwischen dem positiven Nachweis dieser Zellen und der Tumoraktivität, wird zurzeit noch kontrovers diskutiert und ist Gegenstand der derzeitigen Forschung. In aktuellen Studien wird die Zahl der CETCs in die Behandlungsentscheidung einbezogen, da sich hierdurch eine direkte Sichtweise auf das Therapieansprechen versprochen wird und eine Prognose zum Krankheitsverlauf früher und zielgenauer erstellt werden kann (Fehm et al., 2012). Beispielsweise wird bei Patientinnen mit Mammakarzinom bereits früh eine hämatogene Disseminierung von Tumorzellen beobachtet, wobei davon ausgegangen wird, dass das

Vorhandensein von CETCs im metastasierten Zustand mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Cristofanilli et al., 2004; Hayes et al., 2006; Pantel und Alix-Panabières, 2013). Aufgrund der geringen Anzahl der zirkulierenden Tumorzellen pro Milliliter Blut, sind für die Detektion sensitive Methoden notwendig. Es existiert bereits eine Vielzahl innovativer Detektionssysteme, welche morphologische, immunologische, nukleinsäurebasierte und zytometrische Methoden umfassen, jedoch zum Teil eine mangelnde Reproduzierbarkeit und Spezifität aufweisen (Parkinson et al., 2012; Alix-Panabières und Pantel, 2013).

Eine Verbesserung des Nachweises seltener Zellen kann durch neue Verfahren mittels magnetischer Anreicherung erzielt werden. Dabei ist, neben der Erhöhung der Sensitivität, eine spezifische Charakterisierung der angereicherten Zellen von großem Interesse (Fehm et al., 2012). Über genetische Analysen können beispielsweise Aussagen über den Mutationsstatus einer magnetisch markierten Zelle getroffen und somit eine Schlussfolgerung über die Aggressivität der Zelle gezogen werden. Schon seit einiger Zeit sind molekulargenetische Untersuchungen fester Bestandteil der Therapie bei einigen Krebserkrankungen, wie Leukämien und Lymphomen. Der Erfolg der Behandlung sowie das Risiko eines Rezidivs können dank der Analysen abgeschätzt werden. Auch bei der Therapiewahl für Patienten mit einem soliden Tumor, beispielsweise einem kolorektalem Karzinom, spielen genetische Veränderungen eine bedeutende Rolle. Zielgerichtete Therapien mittels monoklonaler Antikörper gegen den EGF-Rezeptor haben die Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms erheblich verbessert. In zahlreichen Studien konnte, mittels Anti-EGFR Antikörpern, ein inhibierender Effekt erzielt und das progressionsfreie Überleben signifikant gesteigert werden (Cunningham et al., 2004). Allerdings wurde für Patienten mit einer vorliegenden Alteration des *RAS*-Gens eine Resistenz des Tumors gegen EGFR-Inhibitoren diagnostiziert. Genetische Veränderungen führen zu einer intrinsischen Aktivierung der EGFR-abhängigen Signaltransduktionskaskade und können durch eine zielgerichtete Behandlung gegen den Rezeptor nicht gehemmt werden (Abb. 4). Zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Migration, Invasion, Angiogenese und Apoptose, geraten so außer Kontrolle.

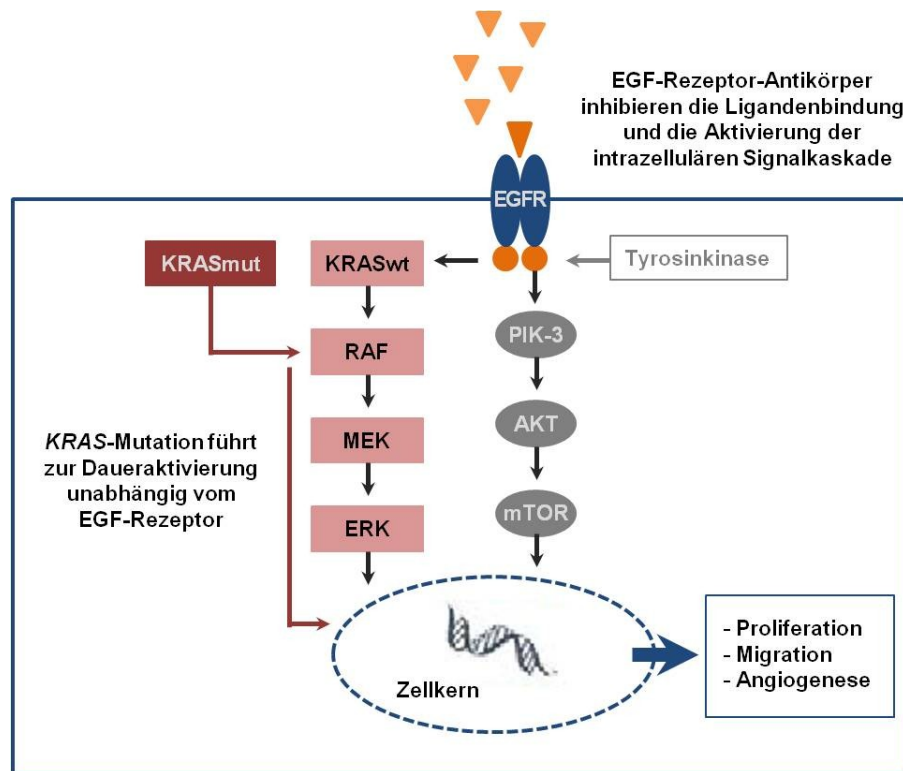


Abb. 4 Einfluss einer *KRAS*-Mutation auf die EGFR-abhängige Signaltransduktion. (AKT - *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*, EGFR - *epithelial growth factor receptor*, ERK - *extracellular signal-regulated kinase*, MEK - *mitogen-activated protein kinase*, KRAS - *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*, mTOR - *mammalian Target of Rapamycin*, mut - mutiert, PIK-3 - *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*, RAF - *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog*, wt - wildtyp; modifiziert nach Stintzing et al., 2009).

1.5.1 Magnetische Zellseparation

Als zukunftssträngige Technologie findet die Nanotechnologie eine breite Anwendung in der medizinischen Forschung. In der Biomedizin werden heute magnetische Nanopartikel (MNP) in vielen Bereichen eingesetzt. Vor allem Nanopartikel aus superparamagnetischem Eisenoxid spielen eine wichtige Rolle bei der Zellmarkierung, dem Targeting, der Hyperthermie und dem gezielten Wirkstofftransport. Die Funktionalisierung eines MNP mit einem Wirkstoff, z.B. durch die Beladung mit Docetaxel, bietet den Vorteil, dieses Zytostatikum an Zielorte im Körper zu transportieren und unter bestimmten Bedingungen freizusetzen. Solche MNP finden beispielsweise Anwendung in der Behandlung von Prostatakarzinompatienten (Hrkach et al., 2012). Des Weiteren werden Eisenoxidpartikel als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie (MRI, Abb. 5) eingesetzt. Auch die gezielte Abtrennung seltener Zellen aus einem Zellgemisch ist in der biomedizinischen Forschung von großem Interesse. Neben der Unterscheidung mittels Zellgröße, Dichte und Markerproteinen auf der

Zelloberfläche, kann die Separation auch nach der Beladung der Zellen mit MNP durch magnetische Eigenschaften erfolgen.

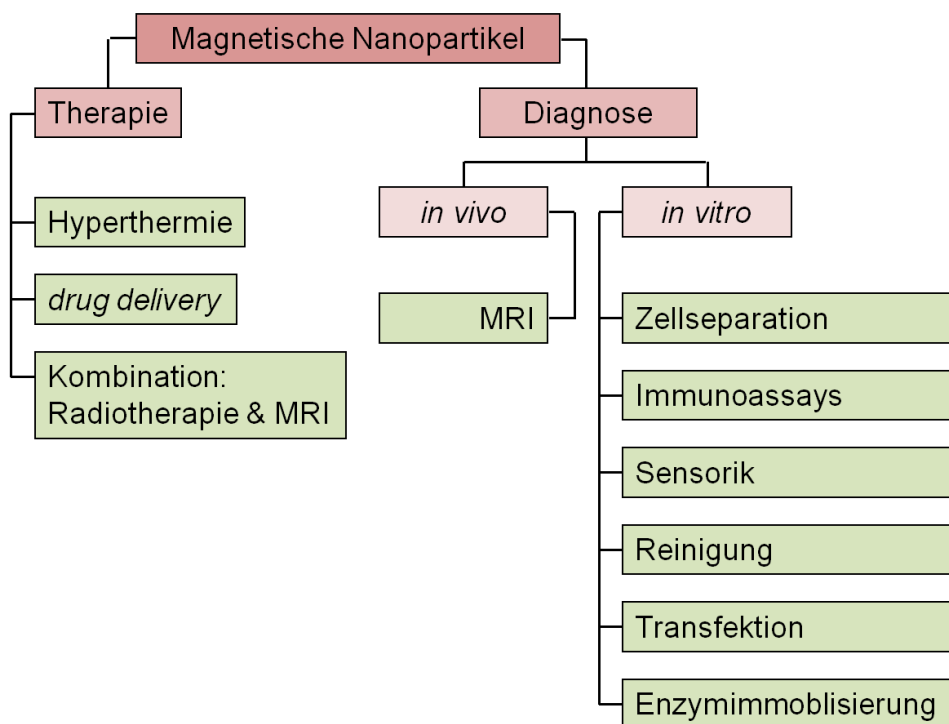


Abb. 5 Anwendungsmöglichkeiten magnetischer Nanopartikel in der Medizin.
(MRI - *magnetic resonance imaging*; modifiziert nach Arruebo et al., 2007).

Um seltene maligne Zellen in wenigen Millilitern Blut zwischen Billionen von Erythrozyten und mehreren Millionen Leukozyten zu entdecken, werden sehr sensitive und spezifische Methoden benötigt. Diese sollten die Untersuchung einer großen Menge an Zellen in einer relativ kurzen Zeit ermöglichen (Joosse und Pantel, 2013). Dafür wurden verschiedene Methoden zur Anreicherung und molekularen Charakterisierung von Tumorzellen im peripheren Blut etabliert. Diese Systeme basieren hauptsächlich auf magnetischen Nanobeads, welche mit Antikörpern gegen epithelspezifische Strukturproteine (z.B. EpCAM, *epithelial cell adhesion molecule*) konjugiert sind. Nachteilig bei dieser Anwendung ist die Betrachtung der reinen EpCAM⁺ Fraktion, da Zellen, ohne den entsprechenden Oberflächenrezeptor, nicht in die Untersuchungen einbezogen werden (Gorges et al., 2012; Alix-Panabières und Pantel, 2013). Für Antikörper-unabhängige magnetische Nanopartikel konnte gezeigt werden, dass eine rasche aktive Aufnahme durch humane Zellen besteht und die resultierende magnetische Beladung der Zellen eine Magnet-basierte Separation ermöglicht (Wagner et al., 2004). Interessanterweise konnte für Polysaccharid-umhüllte magnetische Nanopartikel (Carboxymethyl-Dextran, CMD) eine zelltypabhängige Aufnahmekinetik gezeigt werden

(Clement et al., 2006). Der unterschiedlich schnelle Membranumsatz von Tumorzellen und gesunden primären Zellen, wie Leukozyten, scheint die differenzielle Partikelaufnahme zu bewirken. Untersuchungen zum Aufnahmeverhalten der CMD-MNP durch humane Zellen zeigten, dass die Größe der Partikel entscheidend ist. Während zu kleine (kleiner als 20 nm) Nanopartikel unspezifisch durch die Membran diffundieren, lagern sich zu große Partikel (größer als 500 nm), wenn überhaupt, nur extrazellulär an. Die MNP im Größenbereich dazwischen werden mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen (Conner und Schmid, 2003). Generell scheinen CMD-umhüllte MNP, mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 150 nm, die Möglichkeit zu eröffnen zirkulierende tumorverdächtige Zellen quantitativ aus dem peripheren Blut eines Patienten zu entfernen (Schwalbe et al., 2006b).

1.5.2 Genetische Veränderungen in Tumoren

Die Entdeckung der aberranten *HER2*-Amplifikation beim Mammakarzinom stellte den Beginn zielgerichteter Therapien gegen Onkogene dar (King et al., 1985). Die Untersuchung der Patienten auf die Amplifikation und Überexpression des Gens bietet die Möglichkeit der effektiven Behandlung mit dem humanen monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®). In nachfolgenden Studien konnte ein signifikanter Anstieg für das Gesamtüberleben der Patienten erfasst werden (Slamon et al., 2011). Anknüpfend wurden in den letzten 20 Jahren bedeutende tumorrelevante Mutationen analysiert. Für das Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom wird eine aktivierende Mutation im *EGFR*-Gen beschrieben (Bates et al., 2012), welche mit einem besseren Therapieansprechen für Tyrosinkinase-Inhibitoren assoziiert ist. Gegensätzlich hierzu konnte als resistenz-auslösende genetische Veränderung bei der chronischen myeloischen Leukämie die *BCR-ABL* T315I-Mutation aufgedeckt werden (Gorre et al., 2001). Die Weiterentwicklung der Sequenzierung zur modernen Hochdurchsatztechnologie ermöglicht die umfassende Charakterisierung genetischer Veränderungen einzelner Krebspatienten. Hinzu kommt, dass durch das *Deep Sequencing* die Möglichkeit besteht, Tumoren und Metastasen auf ihre Heterogenität untersuchen zu können und die Entwicklung einzelner Tumorzellklone zurück zu verfolgen. Die Hoffnung ist, dass mit Hilfe der Sequenzierung als Forschungstool die Evolution der Tumoren untersucht und somit weitere Schlüsselmutationen gefunden werden können. Zukünftig könnte durch spezielle Genchips eine Vielzahl von Genen gezielt sequenziert und die Behandlung der Krebspatienten weiter individualisiert werden.

1.5.2.1 Genetische Veränderungen im *KRAS*-, *BRAF*- und *PIK3CA*-Gen

Schon seit einigen Jahren wird sich um die Entschlüsselungen der genetischen Veränderungen bemüht, welche mit der Tumorentstehung und -progression assoziiert sind. Allerdings ist eine breite klinische Anwendung dieser Informationen aufgrund der eingeschränkten Sensitivität der Analysen kritisch. Dank Hochdurchsatz-Genotypisierung besteht die Möglichkeit eine Vielzahl an humanen Tumorproben in kürzester Zeit auf bekannte onkogene Mutationen zu untersuchen. Beispielsweise konnte für Mammakarzinome eine absolute Mutationsrate von 36 % und bei kolorektalen Karzinomen sogar von 50 % festgestellt werden (Thomas et al., 2007). Dabei zeigten die beiden Tumorentitäten verschiedene Mutationshäufigkeiten für die Onkogene *KRAS* (*kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), *BRAF* (*v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) und *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*), wobei das Gen *PIK3CA* beim Mammakarzinom mit 25 % bis 30 % sowie *KRAS* beim Kolonkarzinom mit 40 % am häufigsten mutiert vorliegen (Castaneda et al., 2010; Finkelstein et al., 1993). Darüber hinaus zeigte sich eine unerwartet hohe Anzahl von multiplen Mutationen.

Im Zusammenhang mit *KRAS*-Mutationen werden häufig genetische Veränderungen im *BRAF*-Gen untersucht. Dabei konnte bei metastasierten kolorektalen Karzinompatienten, sowohl im Primärtumor als auch in den Metastasen, keine parallele Mutation in den Genen nachgewiesen werden (Mostert et al., 2013; Miranda et al., 2013). Dennoch scheinen beide Gene einzeln, *KRAS* sowie *BRAF*, mit hoher Wahrscheinlichkeit die gleichen Mutationen in Primärtumor und Metastase aufzuweisen. Beispielsweise konnten Miranda und Kollegen für Patienten des kolorektalen Karzinoms darstellen, dass eine *KRAS*-Mutation im Kodon 12 mit einer hohen Übereinstimmung (mehr als 80 %) in Metastasen der Lymphknoten und Leber wiedergefunden wurden (Miranda et al., 2013). Eine aktivierende *KRAS*-Mutation führt im weiteren Verlauf der Signalkaskade zur Aktivierung der zytosolischen Proteinkinase *BRAF*. Dies führt zu einer anormalen Zellproliferation und Invasion mit gleichzeitiger Inhibierung der Apoptose. Somatisch fehlleitende Mutationen des *BRAF*-Gens treten mit etwa 9 % bei humanen Tumorerkrankungen auf. Für 10 % der kolorektalen Karzinompatienten konnte eine Alteration in diesem Gen aufgezeigt werden, für Mammakarzinome noch seltener (Davies et al., 2002). Die Phosphatidylinositol 3-Kinase ist ebenfalls an der Regulation des Zellwachstums und der Proliferation beteiligt. Somatische Mutationen des *PIK3CA*-Gens konnten bereits in humanen kolorektalen Karzinomen und anderen Tumorentitäten

nachgewiesen werden. Für das Mammakarzinom wurde eine genetische Alteration in 25 % der Fälle beschrieben und das Gen gleichzeitig als häufigstes mutiertes Onkogen identifiziert (Bachman et al., 2004). Hierbei scheinen Patientinnen mit einer Mutation im *PIK3CA*-Gen eine bessere Prognose aufzuweisen, als Patienten mit einem Wildtyp-Gen (Dumont et al., 2012). Für das kolorektale Karzinom werden somatische Mutationen im *PIK3CA*-Gen mit einer Häufigkeit von 13,6 % bis 32 % angegeben (Simi et al., 2008). Thomas et al. konnte für 30 % der genetischen Veränderungen in diesem Gen eine Verknüpfung mit weiteren onkogenen Mutationen zeigen (Thomas et al., 2008). Die Daten von Simi und Kollegen weisen auf eine signifikante Assoziation von *KRAS*- und *PIK3CA*-Mutationen hin. Für 70 % der vorliegenden *PIK3CA*-Mutationen in kolorektalen Karzinompatienten konnte ebenfalls eine *KRAS*-Veränderung identifiziert werden (Simi et al., 2008). Zusätzlich treten Korrelationen zwischen *PIK3CA*- und *BRAF*-Mutationen auf (Janku et al., 2011). Diese Ergebnisse untermauern das Mitwirken dieser Gene in der epithelialen Karzinogenese.

1.5.2.2 Genetische Veränderungen in Einzelzellen

Molekulare Analysen einzelner Tumorzellen aus dem Primärtumor eines Patienten erlauben ein zusätzliches spezifisches Therapiemonitoring. Da oft nur kleine Zellsubpopulationen in einem heterogenen Tumorgewebe beispielsweise eine Therapieresistenz zeigen, ist es erforderlich charakteristische Therapietargets aus diesem Zellpool zu identifizieren. Mittlerweile ist bekannt, dass bei Patienten mit soliden Tumoren maligne Zellen im Blut zirkulieren. Die prognostische Relevanz dieser seltenen disseminierten Zellen wird derzeit viel diskutiert und konnte bereits in mehreren Studien belegt werden (Jäger et al., 2013). Eine genaue Betrachtung des Phänotyps solcher zirkulierender Tumorzellen eröffnet neben einem besseren Verständnis für die Metastasierung auch ein mögliches Potenzial für die Weiterentwicklung der Krebstherapie. Dennoch ist die Untersuchung der molekularen Unterschiede von tumorverdächtigen Zellen im peripheren Blut durch die komplexe Zusammensetzung limitiert. Ein Ansatz, um dieses Problem zu umgehen, ist die Analyse maligner Zellen auf Einzelzellniveau. Die Betrachtung einzelner Zellen erleichtert die Anwendung von Vollblutproben von Krebspatienten für die Modellentwicklung von Medikamenten. Zudem besteht die Hoffnung, dass zukünftig durch eine nicht-invasiv gewonnene Blutprobe (*liquid biopsy*) der Nachweis und das Monitoring wichtiger molekularer Marker gelingt.

Für Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom ist bekannt, dass die Metastasen mit einer hohen Wahrscheinlichkeit (mehr als 80 %) die gleichen Mutationen aufweisen wie ihre zugehörigen Primärtumoren (Mostert et al., 2013; Miranda et al., 2013). Diese Tatsache lässt die Annahme zu, dass im Blut dieser Patienten zirkulierende Tumorzellen mit derselben genetischen Alteration vorhanden sein müssen. Diese Vermutung konnte durch aktuelle Untersuchungen einzelner Arbeitsgruppen bestätigt werden. Beispielsweise konnte eine Konkordanz zwischen *KRAS*-Mutationen in zirkulierenden Tumorzellen und dem Primärtumor aufgezeigt werden (Fabbri et al., 2013). Zusätzlich wurde ein Zusammenhang vom *KRAS*-Mutationsstatus des Primärtumors mit dem Vorhandensein zirkulierender Tumorzellen (CTC, *circulating tumor cell*) diskutiert. Während für mehr als die Hälfte der Patienten mit einer *KRAS*-Mutation CTCs nachgewiesen werden konnten, war dies nur für ein Drittel der Patienten ohne *KRAS*-Mutation im Primärtumor möglich. Somit liegt die Vermutung nahe, dass Patienten mit einer Mutation des *KRAS*-Gens anscheinend eher zur Metastasenbildung neigen als *KRAS*-Wildtyp-Patienten (Fabbri et al., 2013).

Generell zeigen die Ergebnisse für Einzelzelluntersuchungen von zirkulierenden Tumorzellen beim metastasierten Patienten ein sehr heterogenes Bild. Beispielsweise konnten Mostert sowie Gasch bei dem kolorektalen Karzinom keine Übereinstimmung beim Mutationsstatus der zirkulierenden Tumorzellen zum Primärtumor feststellen (Mostert et al., 2013; Gasch et al., 2013). Dagegen detektierten Heitzer und Kollegen *KRAS*- und *PIK3CA*-Mutationen, welche im Primärtumor und in den Metastasen gefunden wurden, ebenfalls in CTCs im Blut. Allerdings konnten auch weitere Mutationen ausschließlich in CTCs beobachtet werden. Diese „neu entdeckten“ genetischen Veränderungen konnten anschließend mittels *Deep Sequencing* auch auf subklonaler Ebene im entsprechenden Primärtumor und Metastasengewebe nachgewiesen werden (Heitzer et al., 2013). Diese Studie scheint den Weg zu ebnen, zirkulierende Tumorzellen bei Krebspatienten als effektive Möglichkeit der Überwachung des Tumorgenoms während der Progression, der Therapie und bei einem Rezidiv zu nutzen. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob über Mutationsanalysen von einzelnen Zellen Rückschlüsse auf das Tumorgeschehen geschlossen werden können.

2 Zielstellung

Zirkulierende Tumorzellen sind für die Bildung von Metastasen verantwortlich und bieten einen wichtigen diagnostischen wie auch therapeutischen Angriffspunkt für die Behandlung von Karzinompatienten. Der Nachweis von zirkulierenden epithelialen Zellen (CETCs) erfolgt über den Zelloberflächenmarker EpCAM, welcher neben der Detektion auch häufig als Zielmolekül für tumorverdächtige Zellen fungiert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es eine unspezifische Anreicherungs-methode für tumorverdächtige Zellen zu etablieren, um EpCAM positive wie auch EpCAM negative Zellen durch weiterführende Analysen zu charakterisieren. Die magnetische Methode basiert auf dem schnelleren Interaktionsverhalten von CETCs mit Carboxymethyl-Dextran-umhüllten (CMD) Nanopartikeln gegenüber den Leukozyten. Hierbei wird ein großes Patientenkollektiv auf das zelluläre Wechselwirkungsverhalten der Dextran-umhüllten Partikel untersucht. Dabei sollen Vollblutproben von Mammakarzinompatienten zu verschiedenen Therapiezeitpunkten gewonnen und die enthaltenen CETCs auf ihre magnetische Markierbarkeit analysiert werden. Gleichzeitig soll die geringere magnetische Beladung der Leukozyten zu einer erfolgreichen Abtrennung der gesunden hämatogenen Zellen führen. Neben der Selektivität soll ebenfalls die Sensitivität der Methode überprüft werden, um eine magnetische Markierung der CETCs auch bei sehr geringer Häufigkeit gewährleisten zu können. Abschließend sollen die angereicherten Zellen weiteren Analysen zugeführt werden und über genetische Untersuchungen näher charakterisiert werden. Hierfür wird eine Methode für Mutationsanalysen auf Einzelzellniveau an humaner Zellkultur etabliert, welche später auch an humanem Patientenmaterial getestet werden sollte. Von der Isolation der einzelnen Zelle und deren DNA-Gewinnung über die Amplifikation der DNA aus einer Einzelzelle bis hin zur Sequenzierung müssen alle Schritte aufeinander abgestimmt werden, um eine wahrheitsgemäße Aussage über den Mutationsstatus einer einzelnen Zelle zuzulassen.

3 Methoden

3.1 Patientenproben

Die Verwendung der EDTA-Vollblutproben tumorerkrankter Patienten wurde durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena genehmigt:

Proben des Mammakarzinoms: 0921-08/02 (458 Proben, 167 Patientinnen)

Proben des kolorektalen Karzinoms: 3739-04/13 (16 Proben, 16 Patienten)

Für die Verwendung der gesunden Probandenblutproben der freiwilligen Spender lag eine Einverständniserklärung vor.

3.2 Blutaufarbeitung

In gesundem Blut stellen die Leukozyten den zahlenmäßig geringsten Volumenanteil der zellulären Bestandteile dar, was eine genaue Untersuchung der weißen Blutkörperchen erschwert. Die Abtrennung der Leukozyten aus dem Vollblut hat sich somit zu einer routinemäßigen Maßnahme vor deren Analyse entwickelt. Eine Möglichkeit bietet die Erythrozytenlyse mit Ammoniumchlorid. Das anti-koagulierende EDTA-Vollblut wurde unter Zugabe des Puffers zur Erythrozytenlyse (Verhältnis 1:10) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 min bei 300 x g sedimentiert. Das entstandene Leukozytenpellet wurde in D-PBS-EDTA resuspendiert und weiteren Untersuchungen zugeführt.

3.3 Zellkultur

Die *in vitro* Kultivierung einer Zellpopulation unter kontrollierten Bedingungen findet breiten Einsatz als Modell-System in der Forschung und Entwicklung, aber auch in der Diagnostik.

Alle zellbiologischen Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellkultivierung der verwendeten humanen Zelllinien (Tab. 2) erfolgte in 75 cm²-Zellkulturflaschen mit 15 ml Medium und 10 % FCS bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ im Brutschrank. Das Passagieren der Zellen wurde alle 3 bis 4 Tage bei einer Konfluenz

von 70 bis 90 % im Verhältnis von 1:2 bis 1:4 durchgeführt. Die Kryokonservierung der Zellkultur erfolgte in Einfriermedium (Kultiviermedium mit 5 % DMSO) in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

Tab. 2 Verwendete humane Zelllinien und deren Kultivierung.

<i>Zelllinie</i>	<i>Ursprung</i>	<i>Wachstum</i>	<i>Kultivierung</i>
A549	Lungenkarzinom	adhärent	DMEM, 10 % FCS
HCT-116	kolorektales Karzinom	adhärent	RPMI, 10 % FCS
HT29	kolorektales Adenokarzinom	adhärent	RPMI, 10 % FCS
K562	chronische myeloische Leukämie	Suspension	RPMI, 10 % FCS
MDA-MB-231	Mammakarzinom	adhärent	DMEM, 10 % FCS
RPMI-8226	Multiples Myelom	Suspension	RPMI, 10 % FCS
T47D	Mammakarzinom	adhärent	RPMI, 10 % FCS

3.4 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch die Detektion von Widerstandsänderungen am Beckmann-Coulter® Z2 (Beckman Coulter, Krefeld).

Für die Zellzahlbestimmung wurden 25 µl der zu analysierenden Zellsuspension mit 10 ml Isoton vermischt und vermessen. Die Berechnung der Zellzahl pro ml erfolgte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors.

3.5 MACS-Zellseparation

Eine Abtrennung der tumorverdächtigen Zellen von der Leukozytenfraktion erfolgt häufig durch eine positive Anreicherung der epithelialen Zellen unter Verwendung des Oberflächenmarkers EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) oder über eine Depletion der hämatopoetischen CD45-positiven Zellen (Joosee und Pantel, 2013). Eine Antikörper-unabhängige Anreicherung tumorverdächtigter epithelialer Zellen kann durch Polysaccharid umhüllte magnetische Nanopartikel erzielt werden. Für Carboxymethyl-Dextran-umhüllte (CMD-umhüllte) magnetische Nanopartikel konnte eine zelltypabhängige Aufnahmekinetik gezeigt werden (Clement et al., 2006). Der unterschiedlich schnelle Membranumsatz von Tumorzellen und gesunden primären Zellen wie Leukozyten, scheint die differenzielle Partikelaufnahme zu bewirken.

Die Auftrennung der magnetisch markierten Probe erfolgte am SuperMACS™ II Separator (*magnetic-activated cell sorting*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Für die Separation der tumorverdächtigen epithelialen Zellen aus Patientenblut wurde 1 ml EDTA-Vollblut für die Blutaufarbeitung (siehe Blutaufarbeitung) eingesetzt. Die Vorversuche mit Zellkulturen wurden mit 1×10^6 Zellen bzw. in Mischversuchen (90 % bzw. 95 % Leukozyten) mit $2,5 \times 10^6$ Zellen durchgeführt. Bei allen durchgeführten Versuchen wurden die Zellen in einem Ausgangsvolumen von 0,5 ml in D-PBS-EDTA resuspendiert. Die erforderliche Trennsäule wurde vor Verwendung mit 0,5 ml D-PBS-EDTA equilibriert. Für die Separation wurden der zu separierenden Zellsuspension 3 μ l der CMD-umhüllten magnetischen Nanopartikel zugegeben (Endkonzentration 50 μ g/ml) und für 4 min bei 37 °C inkubiert. Die magnetisch markierten Zellen wurden über die vorbereitete MS-Separationssäule von den nicht-markierten Zellen abgetrennt. Hierbei konnten die nicht-markierten Zellen die Trennsäule ungehindert passieren. Durch einen zusätzlichen Waschschrift mit 0,5 ml D-PBS-EDTA lag die sogenannte Negativfraktion in einem Gesamtvolumen von 1 ml vor. Die Tumorzellen wurden durch ihre magnetische Markierung im Magnetfeld zurückgehalten und anschließend außerhalb des Magnetfeldes mit 1 ml D-PBS-EDTA in der Positivfraktion gewonnen (Abb. 6). Nach Bestimmung der Zellzahlen der beiden Fraktionen wurden die Zellen weiteren Analysen zugeführt. Um den Einfluss der Therapie auf die Nanopartikelaufnahme zu untersuchen wurden Proben von Mammakarzinompatienten zu verschiedenen Zeitpunkten der Medikation separiert. Die verwendeten Nanopartikel wurden vom Kompetenzzentrum für Polysaccharidforschung der Friedrich-Schiller-Universität Jena zur Verfügung gestellt.

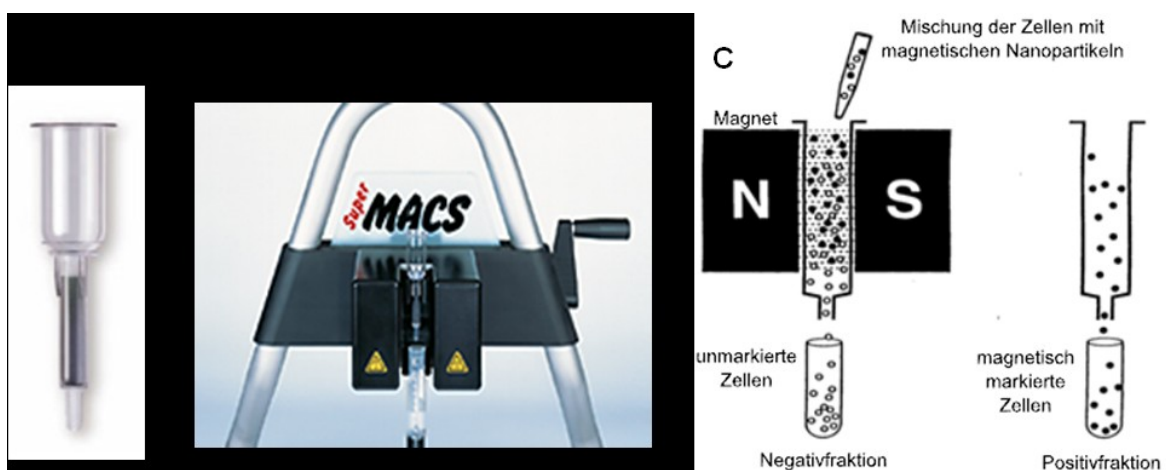


Abb. 6 Magnetisches Separations (MACS)-System. **(A)** MACS-Separationssäule, Typ MS. **(B)** SuperMACS™ II Separator mit der Separationssäule im Magnetfeld. **(C)** Prinzip der magnetischen Zellseparation. Die Zielzellen eines Zellgemisches werden durch Magnetpartikel markiert und auf eine im Dauermagneten befindliche Trennsäule gegeben. Nur die magnetisch nicht-markierten Zellen (helle Kreise) können die Säule ungehindert passieren und werden in der Negativfraktion gesammelt. Die markierten Zellen (schwarze Kreise) werden in der Separationssäule zurückgehalten und außerhalb des Magnetfeldes aus der Säule in die Positivfraktion eluiert (modifiziert nach Wotschadlo, 2013).

3.6 Fluoreszenzmikroskopie

Durch fluoreszenzmikroskopische Bilder können unter anderem genaue Rückschlüsse auf Morphologie, membrangebundene Proteine und Vitalität der betrachteten Zellen gezogen werden.

Für den Nachweis und die Detektion zirkulierender tumorverdächtiger epithelialer Zellen aus Vollblutproben von Karzinompatienten wurden verschiedene bildgebende Verfahren eingesetzt. Die Untersuchungen zur Nanopartikelaufnahme durch tumorverdächtige Zellen von Mammakarzinompatienten während verschiedener Therapiezustände wurden mit Laser Scanning-Cytometrie (LSC™, Cytomation Inc., Fort Collins, CO, USA) durchgeführt. Für die Beobachtung von Verlaufspuben einzelner Patienten wurde der AVISO-CellCelector (ALS, Jena) eingesetzt.

3.6.1 Laser Scanning-Cytometrie

Die Beurteilung tumorverdächtiger Zellen erfolgte über einen FITC-gelabelten Antikörper gegen EpCAM (anti-CD326, *epithelial cell adhesion molecule*) für epitheliale Zellen und einen PE-gelabelten Antikörper gegen den Leukozytenoberflächenmarker CD45. Häufig weisen EpCAM-positive Zellen eine typische kappenförmige Fluoreszenzmarkierung auf, wodurch eine Unterscheidung von Leukozyten von epithelialen Zellen möglich ist (Abb. 7).

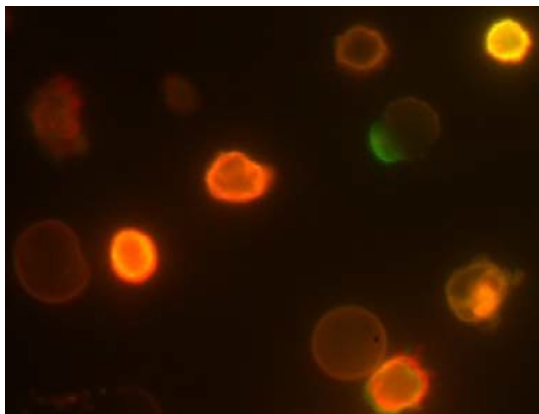


Abb. 7 Mikroskopischer Nachweis epithelialer Zellen mittels LSC (40x). Tumorverdächtige Zellen können durch die kappenförmige Anti-EpCAM Färbung (FITC-gelabelt) identifiziert und von den CD45-positiven Leukozyten (PE-gelabelt) unterschieden werden.

Die nach der MACS-Separation erhaltenen Fraktionen wurden 5 min bei $300 \times g$ sedimentiert und in 100 μ l D-PBS-EDTA resuspendiert. Für die Analyse der Separationsleistung erfolgte die Färbung der nicht-separierten und separierten Proben nach dem in Tab. 3 aufgeführten Protokoll.

Tab. 3 Protokoll zur Bestimmung der zirkulierenden tumorverdächtigen Zellen aus Vollblutproben von Patienten.

<i>Antikörper</i>	<i>Verdünnung</i>			<i>Hersteller</i>
	<i>Unsepariert</i>	<i>Positivfraktion</i>	<i>Negativfraktion</i>	
Anti-EpCAM-FITC	1:40	1:80	1:20	Miltenyi Biotec
Anti-CD45-PE	1:100	1:200	1:50	Miltenyi Biotec
Inkubation für 15 min bei 8°C				

Nach der Antikörperfärbung wurde die Zellsuspension mit D-PBS-EDTA auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt. Jeweils 100 µl der fluoreszenzmarkierten Suspension wurden auf einen Glasobjektträger aufgebracht und mikroskopisch hinsichtlich ihrer Anzahl und EpCAM-Expression beurteilt. Hierbei wurde pro Patient jeweils eine nicht-separierte Probe im Vergleich zu den beiden Fraktionen nach der MACS-Separation analysiert.

3.6.2 AVISO-CellCelector

Die Charakterisierung der Zellen erfolgte ähnlich wie bei der Beurteilung mit dem LSC™ mittels fluoreszierender Antikörper. Die nach der MACS-Separation erhaltenen Zellfraktionen wurden 5 min bei $300 \times g$ sedimentiert und in 20 µl D-PBS-EDTA resuspendiert. Die Zusammensetzung der Markierungslösung und die anschließenden Verdünnungen wurden nach dem Protokoll in Tab. 4 durchgeführt.

Tab. 4 Protokoll zur Bestimmung der zirkulierenden tumorverdächtigen Zellen aus Vollblutproben von Patienten.

<i>Komponenten</i>	<i>Verdünnung</i>			<i>Hersteller</i>
	<i>Unsepariert</i>	<i>Positivfraktion</i>	<i>Negativfraktion</i>	
anti-EpCAM-AlexaFluor 488	1:40	1:80	1:20	Cell Signaling
PI (1 mg/ml)	1:160	1:320	1:80	Sigma-Aldrich
Zugabe von 20 µl D-PBS-EDTA Inkubation für 15 min bei 8°C				
Zugabe D-PBS-EDTA	160 µl	-	960 µl	
Vorbereitung der fluoreszenzmarkierten Zellen in 96 well Platte				
Vorlegen von D-PBS-EDTA		jeweils 150 µl		
Volumen Zellsuspension	20 µl	20 µl	40 µl	

Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden in eine 96 well-Platte überführt und mikroskopisch hinsichtlich ihrer Anzahl, Morphologie und EpCAM-Expression bewertet. Zusätzlich wurde die Vitalität der Zellen berücksichtigt. Hier wurde ebenfalls jeweils eine nicht-separierte Probe mit den beiden Fraktionen nach der MACS-Separation vergleichend gegenübergestellt.

3.7 Fluorescence-Activated Cell Sorting

Bei dem *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS) handelt es sich um ein durchflusszytometrisches Verfahren, welches primär der Betrachtung von Zelleigenschaften, wie Größe, Granularität oder Fluoreszenzfärbung dient. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit Zellgemische hinsichtlich ihrer Zusammensetzung mit Hilfe fluorchromgekoppelter Antikörper zu analysieren (Tab. 5). Die Untersuchungen wurden am FACS-Calibur™ (Becton, Dickinson, Heidelberg) durchgeführt.

Tab. 5 Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome.

<i>Fluorochrome</i>	<i>Absorptionsmaximum</i>	<i>Emissionsmaximum</i>	<i>Farbe</i>
FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)	490 nm	530 nm	grün
PE (Phycoerythrin)	480 nm	578 nm	orange
PI (Propidiumiodid)	500 nm	650 nm	rot

Betrachtet wurden jeweils 10.000 Ereignisse der zuvor angefärbten Patientenproben vor und nach der Separation (siehe 3.5.1 und 3.5.2). Der Erfolg der Separation wurde durchflusszytometrisch anhand der Markierung für EpCAM und CD45 bzw. PI bewertet. Die Auswertung der erhaltenen Messwerte erfolgte mit dem Programm CellQuest Pro.

3.8 Einzelzellpräparation am AVISO-CellCelector

Die Präparation einer einzelnen Zelle aus dem Zellverband ermöglicht die gezielte Betrachtung verschiedener Genabschnitte einer einzelnen Zelle. Damit bietet sich die Möglichkeit seltene Ereignisse in der vorhandenen Heterogenität eines Tumorgewebes genauer zu analysieren.

Die Einzelzellpräparation erfolgte am Zellmanipulator AVISO-CellCelector (Abb. 8). Für die Untersuchungen wurden einzelne Zellen aus Zellkultur sowie aus Vollblutproben von Probanden bzw. Patienten isoliert.



Abb. 8 Der Zellmanipulator AVISO-CellCelector (ALS).

Die Geräteeinheit besteht aus einem Fluoreszenzmikroskop, einem dreidimensional steuerbaren Mikromanipulator und einer Steuereinheit. Die Mikromanipulation der Zellen wurde mit einer 50 μm -feinen Glaskapillare durchgeführt, in welche die Zielzelle aufgesaugt wird. Die Abgabe der isolierten Zelle erfolgte in ein PCR-Röhrchen mit 5 μl Cell Extraction Buffer des *Single Cell WGA Kits* (New England Biolabs, Frankfurt a. M.). Die gewonnene Einzelzelle wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.9 Nukleinsäureisolation

3.9.1 Extraktion aus Einzelzellen

Die Durchführung der *whole genome amplification* (WGA) ermöglicht die Zelllyse einer einzelnen Zelle sowie die PCR-basierte Vervielfältigung der geringen DNA-Menge, wodurch ausreichend Material vorliegt, um verschiedene Analysen durchführen zu können.

Die Isolation und Amplifikation wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers mit dem Single Cell WGA Kit (New England BioLabs) durchgeführt. Die gewonnene DNA wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.9.2 Extraktion aus dem Zellverband

Die Isolierung der DNA aus humaner Zellkultur und Leukozyten von Patientenproben wurde mit dem QIAamp[®] DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend der Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

Für die Extraktion wurden bis zu 5×10^6 Zellen eingesetzt. Die erzielte Ausbeute und Reinheit der isolierten DNA wurde mittels UV/VIS-Spektralphotometrie am NanoDrop 2000 (Thermo Fischer Scientific, Dreieich) ermittelt. Für die Bestimmung der Konzentration in ng/ μ l wurde 1 μ l der DNA-Lösung verwendet. Die Aufbewahrung der isolierten DNA erfolgte bei -20 °C.

3.10 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) zählt zu den wichtigsten Methoden der modernen Molekularbiologie und wird in biologischen sowie medizinischen Laboratorien für eine Vielzahl verschiedener Aufgaben verwendet. Die PCR bietet die Möglichkeit zur *in vitro* Vervielfältigung der Erbsubstanz.

Für die Entscheidung des weiteren Therapievorgehens bei Krebspatienten werden immer häufiger Mutationsanalysen durchgeführt. Häufig sind die Gene *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* von genetischen Veränderungen im Erbgut des Patienten betroffen (Tab. 6). Daher wurden die Mutationsanalysen an den Einzelzellen und am Zellverband für die beschriebenen Gene durchgeführt. Als Referenzgen wurde *RPL13A* zu den Untersuchungen hinzugezogen.

Tab. 6 Untersuchte Gene.

Name (Transkript-ID)	Lokalisation	Größe	Analysiertes Exon
BRAF (ENST00000288602) <i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>	Chomosom 7: reverse strand	2.480 bp	Exon 15 (119 bp)
KRAS (ENST00000311936) <i>kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>	Chromosom 12: reverse strand	5.765 bp	Exon 2 (122 bp)
PIK3CA (ENST00000263967) <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha</i>	Chromosom 3: forward strand	9.093 bp	Exon 20 (152 bp)
RPL13A (ENST00000391857) <i>ribosomal protein L13a</i>	Chromosome 19: forward strand	1.181 bp	Exon 7 + 8 (123 bp + 580 bp)

Die verwendeten Primer (Tab. 7) wurden mit der frei zugänglichen Software *Primer3 Input* ausgewählt und an DNA von Zellkultur getestet.

Tab. 7 Verwendete Primer für die Einzelzell-PCR.

<i>Gen</i>		<i>Sequenz (5'-3')</i>	<i>Produktgröße</i>
BRAF	F	CTC TAA GAG GAA AGA TGA AGT AC	307 bp
	R	GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG AA	
	F	CTT CAT AAT GCT TGC TCT GAT AGG	181 bp
	R	CCA CAA AAT GGA TCC AGA CA	
KRAS	F	AGG TGA GTT TGT ATT AAA AGG TAC TGG	266 bp
	R	GGT CCT GCA CCA GTA ATA TGC	
	F	TAT AAG GCC TGC TGA AAA TGA CT	112 bp
	R	TAT TCG TCC ACA AAA TGA TTC TGA	
PIK3CA	F	CTG AGC AAG AGG CTT TGG AGT A	185 bp
	R	CCT GCT GAG AGT TAT TAA CAG TGC	
RPL13A	F	AGC TCA TGA GGC TAC GGA AA	229 bp
	R	CTT GCT CCC AGC TTC CTA TG	

(F – Forward Primer; R – Reverse Primer)

Die Amplifikation der unterschiedlichen Genabschnitte wurde am Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Der Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 µl wurde wie im beschriebenen Protokoll der Tab. 8 für Einzelzellen angesetzt. Für die PCR mit isolierter DNA aus dem Zellverband (siehe 3.8.2) wurden 20 ng DNA als Ausgangsmaterial eingesetzt.

Tab. 8 PCR-Reaktionsansatz für Einzelzellen und die DNA aus dem Zellverband.

<i>Reagenzien</i>	<i>Volumen für einen Ansatz</i>
Wasser	16,55 µl
10x PCR Gold Puffer	2,5 µl [1x]
MgCl ₂ [25 mM]	1,75 µl [1,75 mM]
dNTPs [2,5 mM]	2,0 µl [0,2 mM]
AmpliTa [®] Gold DNA Polymerase [5 U/µl]	0,2 µl [1 U]
Primer [je 20 µM]	0,5 µl [je 0,4 µM]
DNA-Template	1 µl

Die für die PCR-Reaktion verwendeten Amplifikationsprogramme sind in Tab. 9 bzw. die primerspezifischen Annealing-Temperaturen und Anzahl der Amplifikationszyklen in Tab. 10 angegeben.

Tab. 9 Amplifikationsprogramm für die PCR-Reaktion.

<i>Reaktionsschritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
Initiale Denaturierung	95°C	10 min
Amplifikation (Primerspezifische Zyklenzahl)	95°C Primerspezifische Annealing-Temp. 72°C	30 sec 30 sec 30 sec
Finale Elongation	72°C	10 min

Tab. 10 Primerspezifische Annealing-Temperaturen und Amplifikationszyklen für die PCR-Reaktion.

<i>Gen</i>		<i>Annealing-Temperatur</i>	<i>Anzahl der Amplifikationszyklen</i>
BRAF	<i>1. PCR</i>	56°C	45 x
	<i>2. PCR</i>	54°C	45 x
KRAS	<i>1. PCR</i>	60°C	35 x
	<i>2. PCR</i>	60°C	45 x
PIK3CA		56°C	45 x
RPL13A		60°C	45 x

Für die Überprüfung der PCR-Produkte wurde anschließend ein Teil der Proben auf ein 3 %-iges mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarosegel aufgetragen.

3.11 Sequenzierung

Das Ablesen der Nukleotid-Reihenfolge eines DNA-Moleküls hat die Wissenschaft revolutioniert und ist heutzutage aus einem molekularbiologischen Labor nicht mehr wegzudenken. Es gibt mehrere Verfahren der DNA-Sequenzierung, wobei lange Zeit Weiterentwicklungen der Methode nach Frederick Sanger ihren Einsatz fanden. Modernere Ansätze bieten die Möglichkeit einer schnelleren Sequenzierung durch Hochdurchsatzverfahren. Somit liegt nahe die DNA-Sequenzierung als ein Forschungstool zu nutzen, welches bei dem Verständnis für die Tumorentwicklung und der Entdeckung von Schlüsselmutationen behilflich ist. Zukünftig werden Genanalysen einen erheblichen Einfluss auf Therapieentscheidungen haben.

3.11.1 Sanger-Sequenzierung

Sangers Methode zur Sequenzierung von DNA ist ein enzymatisches Verfahren und wird auch als Kettenabbruch-Synthese bezeichnet (Pareek et al., 2011). Die DNA-Polymerase

verlängert ausgehend von einem definierten Anfangspunkt, der bekannten Primersequenz, einen der beiden komplementären DNA-Stränge. Wird in den neusynthetisierten Strang ein sogenanntes Kettenabbruch-Didesoxynukleintriphosphat (ddNTP) eingebaut, ist eine Verlängerung der DNA nicht möglich. Diesen ddNTPs fehlt die 3'-Hydroxygruppe, wodurch eine Verknüpfung zum nächsten Nukleotid nicht möglich ist. In Folge dessen entstehen DNA-Fragmente ungleicher Länge. Zusätzlich können durch den Einsatz unterschiedlich fluoreszenzmarkierter ddNTP alle ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP) in einem Reaktionsansatz verwendet werden. Die entstandenen Kettenabbruchprodukte werden aufgrund ihrer Länge mit Hilfe von Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die eingebauten ddNTPs mittels eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die Abfolge der Fluoreszenzsignale gibt direkt die Sequenz der Nukleotide des synthetisierten DNA-Stranges wieder. Mittels Sanger-Sequenzierung können Alterationen in der DNA-Sequenz wie Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen detektiert werden. Die analytische Sensitivität der Methode liegt bei 10 bis 30 %.

Die Durchführung der Sanger-Sequenzierung erfolgte am ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und der vom Hersteller zur Verfügung gestellten Software. Die Zielgene wurden mittels PCR amplifiziert und gemäß dem beschriebenen Protokoll in Kapitel 3.9 analysiert. Die anschließende Aufreinigung der PCR-Fragmente erfolgte mit ExoSAP. Der Mix aus Exonuklease und Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) wurde in einem Verhältnis von 1:5 angesetzt und 2 µl zu 1 µl PCR-Produkt gegeben. Bei einer Inkubation bei 37°C für 15 min wurden ungenutzte Primer und freie Nukleotide abgebaut. Die effiziente Inaktivierung des ExoSAPs erfolgte durch eine 15 minütige Inkubation bei 80°C. Das PCR-Produkt wurde mit 8 µl Wasser verdünnt und in die vorbereitende PCR zur Sanger-Sequenzierung eingesetzt. Anders als bei der herkömmlichen PCR wird bei dieser PCR lediglich ein Primer eingesetzt, wodurch die DNA monodirektional amplifiziert wird. Um die Ergebnisse zu verifizieren und die Zuverlässigkeit der Sequenzierung zu bestätigen wurde der Genabschnitt in *forward* und *reverse* Richtung analysiert. Der Reaktionsansatz im Gesamtvolumen von 20 µl wurde wie im beschriebenen Protokoll der Tab. 11 mit dem BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) angesetzt.

Tab. 11 Reaktionsansatz für die vorbereitende PCR zur Sanger-Sequenzierung.

<i>Reagenzien</i>	<i>Volumen für einen Ansatz</i>
Wasser	12 µl
BigDye Terminator RR 100 Ready Reaction Premix v1.1	2 µl
BigDye Sequencing Buffer	3 µl
Primer [10 µM]	1 µl
verdünntes ExoSAP-PCR Produkt	2 µl

Das für die PCR verwendete Amplifikationsprogramm ist in Tab. 12 angegeben.

Tab. 12 Amplifikationsprogramm für die vorbereitende PCR zur Sanger-Sequenzierung.

<i>Reaktionsschritt</i>		<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
Initiale PCR-Aktivierung		96°C	30 sec
Amplifikation	25 Zyklen	Denaturierung	96°C 30 sec
		Annealing	50°C 15 sec
		Elongation	60°C 2 min
Kühlung		4°C	hold

Mit Hilfe des DyeEx-Kits (Qiagen) wurden nicht eingebaute fluoreszenzmarkierte ddNTPs besonders wirksam und schnell über Gelfiltrations-Säulen aus den Sequenzieransätzen entfernt. Die aufgereinigten einzelsträngigen PCR-Produkte wurden in eine mit 10 µl Formamid vorbereitete Sequenzierplatte überführt und am 3500 Genetic Analyser analysiert.

3.11.2 Pyrosequenzierung

Für die Bestimmung der Häufigkeit von Genmutationen bietet sich die Pyrosequenzierung an. Diese Methode basiert auf dem Prinzip *sequencing by synthesis*, wobei über ein spezielles Enzymsystem die Synthese des komplementären DNA-Strangs beobachtet werden kann. Die Sequenz des zu untersuchenden Genabschnittes muss zu diesem Zweck zuvor bekannt sein. Anders als bei der Kettenabbruch-Synthese ist an einem der verwendeten Primer Biotin gekoppelt, wodurch das PCR-Amplikon markiert wird. Streptavidin-Sepharose Beads binden an das Biotin und ermöglichen die Gewinnung des DNA-Einzelstrangs. Mit Hilfe eines spezifischen Sequenzierprimers der an den Einzelstrang bindet, wird der Startpunkt für die DNA-Polymerase festgelegt. Nachfolgend werden die Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs) einzeln nacheinander in einer festgelegten Abfolge dem Reaktionsansatz zugegeben. Wird das zugegebene dNTP erfolgreich durch die DNA-Polymerase eingebaut, aktiviert das

freigesetzte Pyrophosphat (PPi) eine Enzymkaskade. Mittels ATP-Sulfurylase, welche Adenosin-Phosphosulfat (APS) als Substrat verwendet, wird das freigesetzte PPi zu Adenosintriphosphat (ATP) umgesetzt. Das entstandene ATP treibt die Luziferase-Reaktion an, wodurch Luziferin in Oxyluziferin umgewandelt wird. Dies führt zu einem Lichtsignal, welches mit einer CCD Kamera detektiert und als Pyrogramm ausgegeben wird. Die Stärke des Lichtsignals ist dabei proportional zum verbrauchten ATP und dadurch direkt proportional zur Menge eingebauter Nukleotide. Die nicht-verbrauchten oder nicht-komplementären Nukleotide werden vor Zugabe des folgenden dNTPs durch die Apyrase abgebaut. Durch diese Art der Sequenzierung kann eine analytische Sensitivität von 5 % erzielt werden.

Das Vorhandensein einzelner Punktmutationen im *KRAS*-Gen wurde mittels Pyrosequenzierung am PyroMark Q96 ID (Qiagen) untersucht und entsprechend der Herstellerempfehlungen durchgeführt. Für die häufig auftretenden Mutationen im Kodon 12 und 13 des *KRAS*-Gens wurden SNP (*single nucleotide polymorphism*)-Assays mit der vom Hersteller gelieferten Software PyroMark Assay Design 2.0 etabliert (Tab. 13). Der Reaktionsansatz und das Amplifikationsprotokoll für die PCR entsprechen denen der Einzelzellanalysen (siehe Kapitel 3.10). Lediglich die Anzahl der benötigten Amplifikationszyklen erhöhte sich für alle verwendeten Primer auf 50 Zyklen. Die Auswertung erfolgte über die PyroMark ID 1.0 Software.

Tab. 13 Verwendete Primer für die Pyrosequenzierung.

<i>Gen</i>		<i>Sequenz (5'-3')</i>		<i>Produktgröße</i>
KRAS		F	AGG TGA GTT TGT ATT AAA AGG TAC TGG	266 bp
		R	GGT CCT GCA CCA GTA ATA TGC	
<i>nested PCR</i>	G12 (Kodon 12)	F	GGC CTG CTG AAA ATG ACT G	80 bp
		R-b	AGC TGT ATC GTC AAG GCA CTC T	
		S	CTT GTG GTA GTT GGA GC	
<i>nested PCR</i>	G13 (Kodon 13)	F-b	TAT AAG GCC TGC TGA AAA TGA CT	112 bp
		R	TAT TCG TCC ACA AAA TGA TTC TGA	
		S	GCA CTC TTG CCT ACG	

(F – Forward Primer; R – Reverse Primer; S – Sequenzierprimer; b – biotinylierter Primer)

3.12 Statistik

Für die Untersuchung der prozentualen Anreicherung der tumorverdächtigen Zellen zur Gesamtzellzahl vor und nach der MACS-Separation wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet. Mit dem parameterfreien statistischen Homogenitätstest kann die Zugehörigkeit zweier unabhängiger Verteilungen zur Grundgesamtheit beurteilt werden. Dabei werden p Werte kleiner 0,05 als statistisch signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Magnetische Anreicherung zirkulierender epithelialer Zellen

Zirkulierende Tumorzellen (CETCs; *circulating epithelial tumor cells*) sind als Marker für das Therapieansprechen eines Patienten und die Therapiekontrolle von zunehmender Bedeutung. Eine Anreicherung der selten vorkommenden Zellen (Häufigkeit: 10^{-3} bis 10^{-7}) würde eine umfassende Untersuchung dieser Tumorzellen zulassen.

Für magnetische Nanopartikel (MNP) konnte gezeigt werden, dass eine rasche aktive Interaktion mit humanen Zellen besteht und durch die resultierende Beladung der Zellen eine Magnet-basierte Separation möglich ist (Wagner et al., 2004). Interessanterweise konnte eine vom Zelltyp abhängige Aufnahmekinetik für Carboxymethyl-Dextran-umhüllte (CMD-umhüllte) MNP nachgewiesen werden. Mammakarzinomzelllinien zeigen innerhalb der ersten 4 min bis 12 min eine wesentlich schnellere Wechselwirkung mit den magnetischen Partikeln als primäre Zellen wie Leukozyten (Clement et al., 2006). Infolgedessen eröffnet sich die Möglichkeit, zirkulierende Tumorzellen aus dem peripheren Blut eines Patienten zu reduzieren.

4.1.1 Etablierung der Separationsmethode

Zunächst sollten die Wechselwirkungen von Zellen zu MNP in Abhängigkeit vom Zelltyp und dem eingesetzten Hüllmaterial der Nanopartikel untersucht werden. Eine vollständige magnetische Markierung innerhalb von 4 min und somit eine komplette Abtrennung der Tumorzellen, bei möglichst geringem Verlust der Leukozyten, sollte erzielt werden.

Zu diesem Zweck wurde einerseits der Einfluss der MNP-Umhüllung studiert und zusätzlich CMD-umhüllte Partikel unterschiedlicher Syntheseformen getestet. Nach der Herstellung liegt das synthetisierte CMD neutralisiert als Natriumsalz-Verbindung vor (CMD-Na). Durch den Austausch der Na^+ -Ionen gegen H^+ -Ionen sollte die Beeinflussung der Protonierung der CMD-Hülle auf das Wechselwirkungsverhalten mit humanen Zellen untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass die einzelnen Zelltypen, Leukozyten sowie CETCs, unterschiedlich stark mit den verschiedenen umhüllten MNP interagieren. Der Einfluss der verschiedenen MNP-Hüllmaterialien auf das Aufnahmeverhalten der Zellen wurde an Vollblutproben von

Mammakarzinompatienten untersucht. Hierfür wurde das Blut von Patienten in Nachsorge ($n = 5$) gepoolt und für die Blutlyse eingesetzt. Nach der MACS-Separation mit verschiedenen umhüllten Partikeln wurden die erhaltenen Fraktionen mit einem FITC-gelabelten Antikörper gegen EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*) und einem PE-gelabelten Antikörper gegen den Leukozytenmarker CD45 angefärbt. Mittels durchflusszytometrischer Verfahren konnte die Zusammensetzung der Probe bestimmt werden.

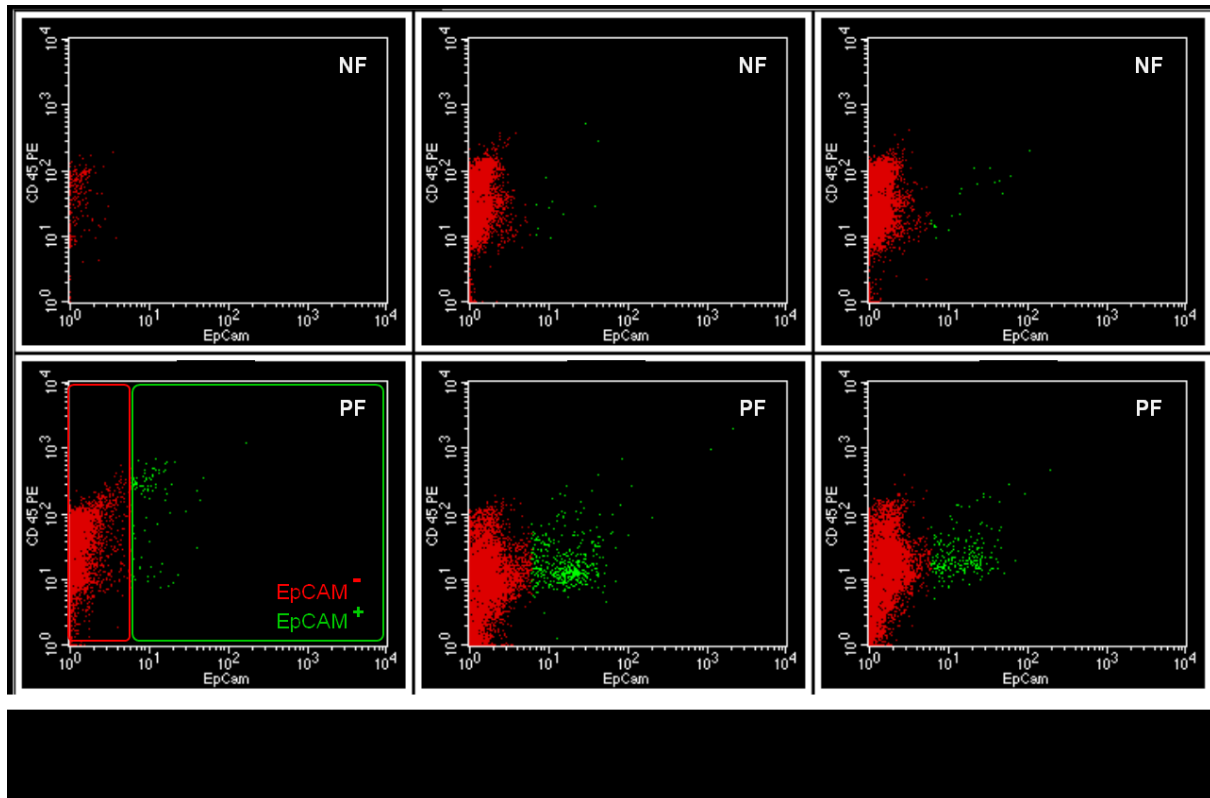


Abb. 9 Darstellung durchflusszytometrischer Untersuchungen verschiedener Nanopartikelumhüllungen auf das Interaktionsverhalten von humanen Zellen aus der Vollblutprobe eines Karzinompatienten.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde der Anteil EpCAM-positiver (EpCAM^+ ; *epithelial cell adhesion molecule*) und EpCAM-negativer (EpCAM^-) Zellen in den Fraktionen nach der MACS-Anreicherung ermittelt (PF - Positivfraktion, NF - Negativfraktion). Dabei wurden verschiedene Umhüllungen der magnetischen Nanopartikel (MNP) vergleichend getestet und auf das Interaktionsverhalten durch humane Zellen untersucht. Während die nicht-umhüllten Partikel eine unspezifische Wechselwirkung mit den Zellen zeigten, konnte für die umhüllten MNP eine selektive magnetische Beladung der tumorverdächtigen EpCAM^+ Zellen gezeigt werden. Zusätzlich konnte ein Unterschied zwischen den synthetisierten Formen des Carboxymethyl-Dextrans (CMD) festgestellt werden. Die Säureverbindung (CMD-H) zeigte eine geringfügig bessere Interaktion mit den EpCAM^+ Zellen gegenüber der herkömmlichen Salzform (CMD-Na).

Über die Markierung der Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern konnte die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten in sogenannten Dotplots (Abb. 9) dargestellt und die Unterschiede in den einzelnen Proben untersucht werden. Um zu analysieren, welche Zelltypen mit den magnetischen Partikeln interagiert haben, wurden die erhaltenen EpCAM Events gegen die Fluoreszenzsignale von CD45 aufgetragen. Gesunde humane Leukozyten

besitzen einen Oberflächenrezeptor für das membranständige Protein CD45, aber keinen für EpCAM und befinden sich somit im linken Bereich des dargestellten Dotplots. Diese Zellen werden als EpCAM⁻ Zellen bezeichnet. Die EpCAM⁺ und somit tumorverdächtigen Zellen werden im rechten Bereich des Blots dargestellt. Für die CMD-umhüllten MNP konnte gegenüber den nicht-umhüllten Partikeln ein positiver Effekt einer Anreicherung gezeigt werden. Während die nicht-umhüllten MNP alle Zellen, sowohl EpCAM⁺ als auch EpCAM⁻, magnetisch markierten und nur noch einzelne EpCAM⁻ Events in der Negativfraktion (NF) detektiert werden konnten, interagieren die umhüllten Partikel selektiver. Für diese Partikel konnte nach der MACS-Separation in der angereicherten Positivfraktion (PF) eine deutliche Zunahme der EpCAM⁺ Ereignisse im rechten Dotplotbereich erzielt werden. Eine große Zahl an EpCAM⁻ Zellen liegt nach der Separation magnetisch nicht-markiert in der NF vor. Zusätzlich war ein Unterschied bei der Art der Umhüllung festzustellen. Die Säureform (CMD-H) zeigte eine bessere Interaktion mit den EpCAM⁺ Zellen gegenüber der herkömmlichen Salzverbindung (CMD-Na).

Durch die Bestimmung der Zellzahlen in der separierten Positiv- und Negativfraktion wurde ersichtlich, dass die magnetische Markierung der nach der Separation detektierten Tumorzellen mit den CMD-umhüllten MNP selektiver ist als mit den nicht-umhüllten Partikeln. Durch die Separation mit den nicht-umhüllten MNP wurden 72 % der eingesetzten Zellen magnetisch markiert, wobei zwar alle CETCs (100 %; bezogen auf die CETC-Gesamtzahl nach Separation) erfolgreich mit den MNP interagierten allerdings auch 98 % der Leukozyten mit den „nackten“ Partikel wechselgewirkt haben. Hingegen wurden durch die Umhüllung mit CMD, in Säure- oder Salzform, nur 6 % der separierten Zellen magnetisch beladen (Abb. 10 A). Bei Betrachtung der Positivfraktion fällt auf, dass bezogen auf die CETC-Gesamtzahl nach der Separation mit den CMD-H umhüllten Partikeln mehr CETCs markiert wurden (73 %) als mit der herkömmlichen CMD-Na Form (MNP@CMD-Na, 48 %). Dabei blieb die Interaktionsrate der Leukozyten mit 5 % bzw. 3 % vergleichsweise gering (Abb. 10 B). Die Untersuchung des auftretenden Zellverlustes ergab einen eindeutigen Vorteil für die umhüllten Partikel (Abb. 10 C). Während 60 % der eingesetzten Zellen durch eine Separation mit den nicht-umhüllten MNP verloren gingen, konnte der Verlust durch Verwendung der CMD-H umhüllten Partikel auf 39 % minimiert werden. Eine magnetische Anreicherung unter Verwendung von MNP@CMD-Na wies einen Zellverlust von 54 % auf. Die erhaltenen Ergebnisse konnten in Versuchen an humanen Tumorzelllinien bestätigt

werden. Daher wurde für die nachfolgenden Separationsversuche die Säureverbindung der CMD-umhüllte MNP (MNP@CMD-H) verwendet.

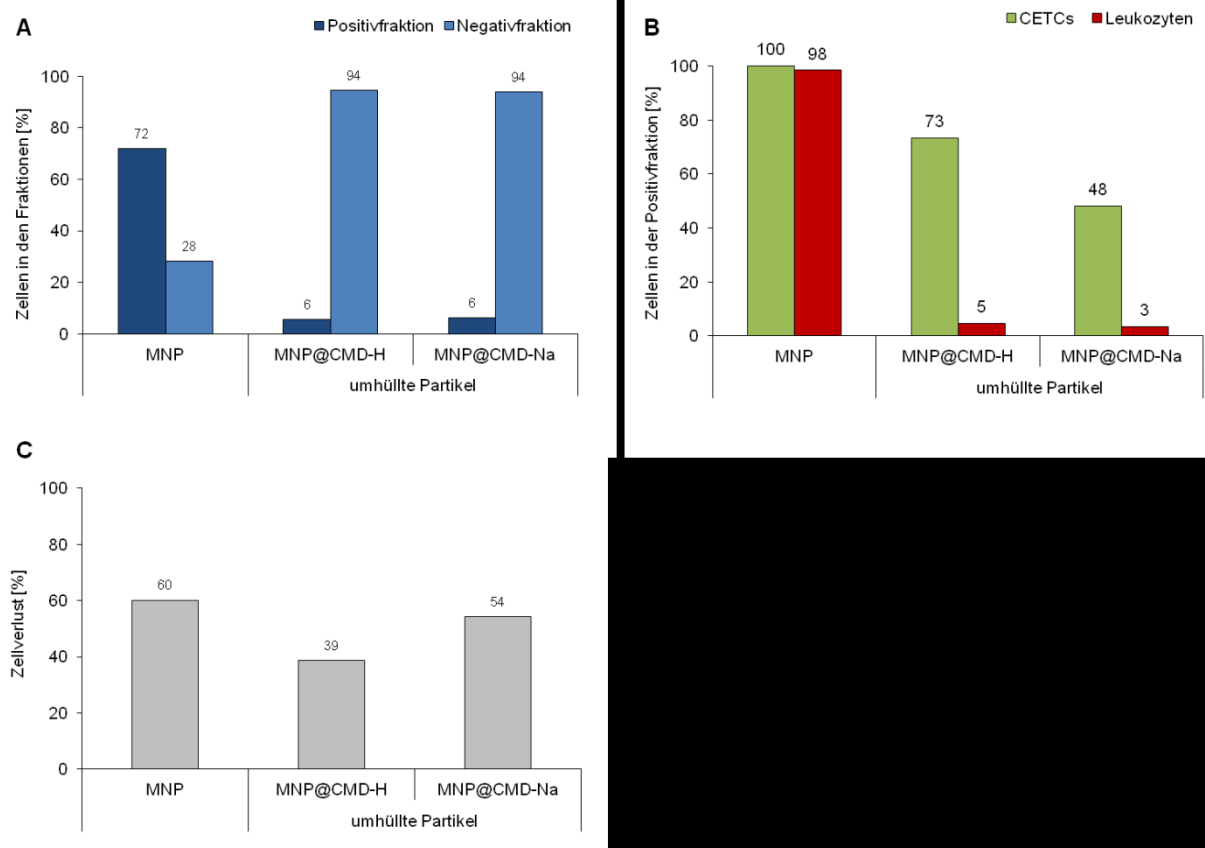


Abb. 10 MACS-Separation humaner Zellen aus der Vollblutprobe eines Karzinompatienten mit unterschiedlich umhüllten Nanopartikeln (n = 1, am Patientenpool).

(A) Zellzahlbestimmung in den separierten Fraktionen (bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation): die nicht-umhüllten magnetischen Nanopartikel (MNP) zeigten mit 72 % der Zellen in der Positivfraktion (PF) eine hohe Interaktionsrate zu den humanen Zellen. Für die Carboxymethyl-Dextran (CMD) umhüllte MNP konnte eine geringere magnetische Beladung der Zellen erzielt werden (6 %). **(B)** Bestimmung des CETC- bzw. Leukozytenverhältnisses nach der Anreicherung in der PF (bezogen auf die Gesamtzellzahl der CETCs bzw. Leukozyten nach der Separation): bei Betrachtung der Zelltypen in der positiven Fraktion fällt auf, dass die MNP mit der Säureform der CMD-Umhüllung (MNP@CMD-H) mehr tumorverdächtige Zellen magnetisch markiert (73 % CETCs), als die MNP mit der Natriumsalz-Verbindung (MNP@CMD-Na; 48 % CETCs). Die Leukozyten zeigten dagegen mit 3 % bis 5 % eine wesentlich schwächere MNP-Beladung. Für die nicht-umhüllten MNP konnte keine unterschiedliche magnetische Markierung der Zellen beobachtet werden. **(C)** Bestimmung des auftretenden Zellverlustes (bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation): die CMD-H umhüllten MNP zeigten gegenüber den CMD-Na umhüllten oder nicht-umhüllten MNP den geringsten Zellzahlverlust.

Neben CMD wurden weitere Polysaccharide als Hüllmaterialien für eine magnetische Anreicherung der Tumorzellen getestet und der Einfluss der Carboxymethylierung von Cellulose (CMC) und Pullulan (CMP) vergleichend getestet. Für die Umhüllung der MNP wurde das gleiche magnetische Fluid verwendet, um das entstehende unterschiedliche Interaktionsmuster zu den Zellen auf das Hüllmaterial zurückführen zu können. Hierfür wurden bei jedem Experiment Blutproben von Mammakarzinompatienten in Nachsorge

miteinander gepoolt und für die Blutlyse eingesetzt. Wie bei der Testung der carboxymethylierten Hüllmaterialien wurden die Proben nach der MACS-Separation mit den fluoreszierenden Antikörpern markiert und mittels Durchflusszytometrie vermessen. Bei Betrachtung der Zellzahlen in den einzelnen Fraktionen nach der magnetischen Anreicherung war ein deutlicher Unterschied im prozentualen Anteil der Zellen in der positiven Fraktion zu erkennen. Während mit den CMD-umhüllten MNP nur 8 % der Zellen magnetisch markiert werden konnten, wurden mittels der MNP@CMP 26 % und mit CMC-umhüllten Partikeln sogar 49 % der separierten Zellen ausreichend magnetisch beladen (Abb. 11 A).

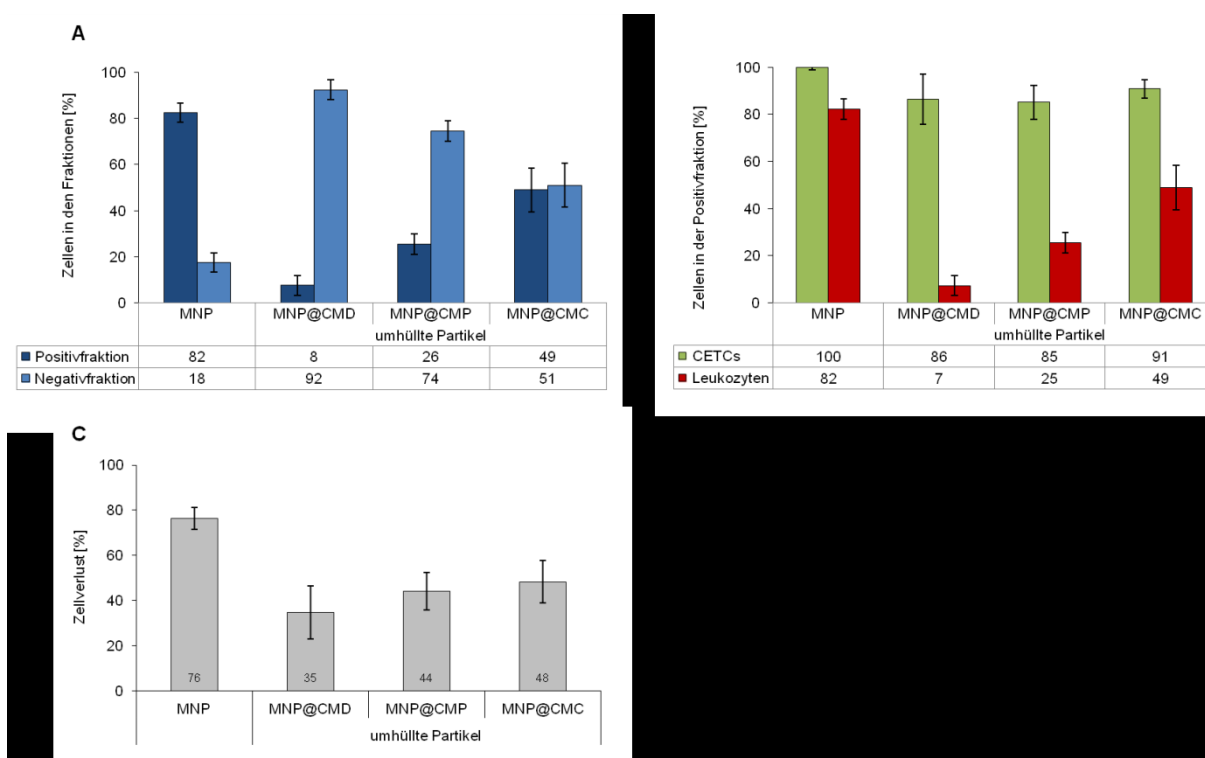


Abb. 11 MACS-Separation humaner Zellen aus der Vollblutprobe eines Karzinompatienten mit unterschiedlich umhüllten Nanopartikeln (n = 6).

(A) Zellzahlbestimmung in den separierten Fraktionen (bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation): die nicht-umhüllten magnetischen Nanopartikel (MNP) zeigten mit 82 % der Zellen in der Positivfraktion (PF) eine hohe Interaktionsrate mit den humanen Zellen. Für die Carboxymethyl-Dextran (CMD) umhüllten MNP konnte eine geringe magnetische Beladung der Zellen festgestellt werden (8 %). Eine Carboxymethylierung von Pullulan (CMP) und Cellulose (CMC) zeigten mit 26 % bzw. 49 % eine deutlich höhere magnetische Markierung der separierten Zellen mit den umhüllten Partikeln. **(B)** Bestimmung des CETC- bzw. Leukozytenverhältnisses nach der Anreicherung in der PF (bezogen auf die Gesamtzellzahl der CETCs bzw. Leukozyten nach der Separation): bei Betrachtung der Zelltypen in der positiven Fraktion fällt auf, dass durch alle MNP-Varianten mehr als 85 % der tumorverdächtige Zellen (CETCs) magnetisch beladen wurden. Allerdings interagierten die Leukozyten mit den MNP@CMP sowie MNP@CMC wesentlich stärker, gegenüber den CMD-Partikeln. Für die nicht-umhüllten MNP konnte keine unterschiedliche magnetische Markierung der Zellen beobachtet werden. **(C)** Bestimmung des auftretenden Zellverlustes (bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation): die MNP@CMD umhüllten MNP zeigten mit 35 % den geringsten Zellzahlverlust.

Bei der Untersuchung der Positivfraktion ergab sich für die CETCs ein unterschiedlicher Anreicherungsfaktor. Alle getesteten MNP-Varianten zeigten mit mindestens 85 % ein sehr gutes Interaktionsverhalten mit den CETCs (bezogen auf die CETC-Gesamtzahl nach der Separation). Allerdings konnte ein großer Unterschied in der prozentualen Verteilung der Leukozyten in der Positivfraktion festgestellt werden. Durch die Separation mit CMD-umhüllten Partikeln wurden nur 7 % der vorhandenen Leukozyten magnetisch markiert (Abb. 11 B). Mehr als dreimal so viele Leukozyten befanden sich nach der MACS-Separation mit CMP-umhüllten Partikeln in der Positivfraktion (25 %) und nahezu die Hälfte der verfügbaren Leukozyten (49 %) wurden durch die CMC-Nanopartikel beladen. Somit konnte mit MNP@CMD gleichzeitig die beste Abtrennung der Leukozyten sowie die einträglichste Anreicherung der CETCs erzielt werden. Auch bei dem Vergleich der Zellverluste zeigten die CMD-umhüllten MNP mit 35 % ein besseres Ergebnis gegenüber den CMP- (44 %) oder CMC-umhüllten Partikeln (48 %; Abb. 11 C). Wie auch bei den Versuchen zuvor war mit den nicht-umhüllten magnetischen Nanopartikeln keine selektive Anreicherung der CETCs möglich und mit 76 % ein sehr hoher Zellverlust zu verzeichnen. Für die nachfolgenden Versuche wurde daher die magnetische Anreicherung der CETCs mittels MACS-Separation mit den CMD-umhüllten MNP durchgeführt.

Um bei den Patientenseparationsuntersuchungen eine ausreichende Sensitivität zu gewährleisten, wurden verschiedene Verdünnungen von Tumorzellen und Leukozyten in Separationsversuchen getestet. Die EpCAM⁺ Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde zu Leukozyten aus einer Vollblutprobe eines Probanden in den Verdünnungen von 5 %, 0,5 % und 0,05 % untergemischt, mit CMD-umhüllten MNP für 4 min, 8 min oder 12 min inkubiert und anschließend mittels der MACS-Methode separiert. Die Auswertung der einzelnen Fraktionen erfolgte nach der Fluoreszenzmarkierung durchflusszytometrisch am FACS-Calibur™.

Durch die Inkubationszeiten von 4 min bis 12 min wurde die Interaktionskinetik der Zellen zu den umhüllten Nanopartikeln sehr gut ersichtlich und zeigte, wie die magnetische Markierung der Zellen stetig mit der Zeit anstieg (Abb. 12 A). Während nach der 4-minütigen Inkubation 34 % bis 42 % der Zellen mit den Nanopartikeln interagierten, so hat sich diese Zahl nach 12 min nahezu verdoppelt (63 % bis 80 %). Wird der prozentuale Anteil der Tumorzellen in der Positivfraktion betrachtet so fällt auf, dass schon nach 4 min mehr als 70 % der vorliegenden Tumorzellen nach der Separation erfolgreich markiert wurden.

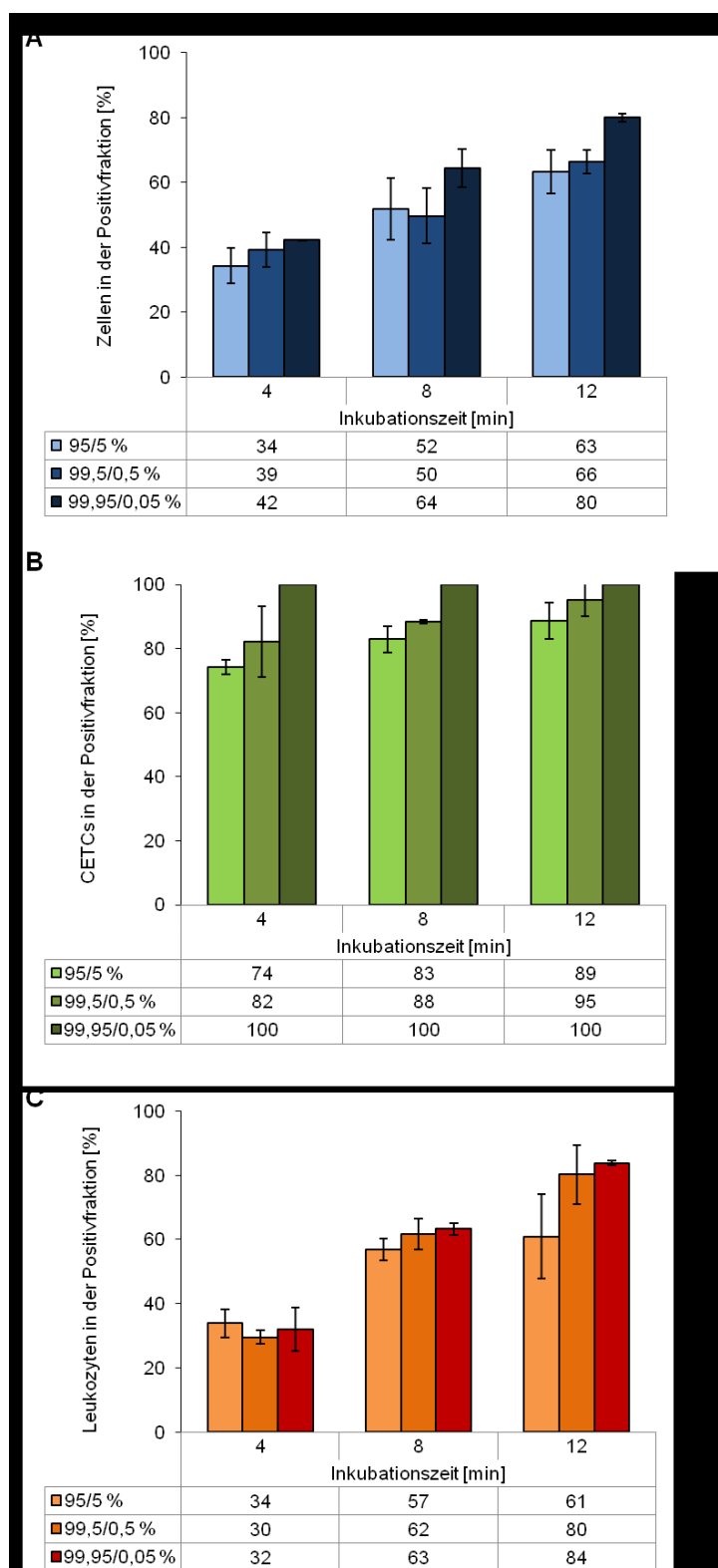


Abb. 12 Untersuchung unterschiedlicher Inkubationszeiten der Nanopartikel auf das Aufnahmeverhalten von humanen Zellen (n=2).

(A) Zellzahlbestimmung in den separierten Fraktionen (bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation): magnetische Markierung der Zellen steigt mit zunehmender Zeit an. **(B)** Bestimmung des CETC-Verhältnisses nach der Anreicherung in der Positivfraktion (bezogen auf die CETC-Gesamtzahl nach der Separation): magnetische Markierung der Tumorzellen (CETCs) steigt mit zunehmender Zeit und Verdünnung an. **(C)** Bestimmung des Leukozytenverhältnisses nach der Anreicherung in der Positivfraktion (bezogen auf die Gesamtleukozytenzahl nach der Separation): magnetische Markierung der Leukozyten steigt mit zunehmender Zeit an.

Weiterhin ist auffallend, dass mit steigender Verdünnung der Tumorzellen diese besser in der Positivfraktion angereichert werden konnten. Nach 4 min konnten 74 % der Tumorzellen der niedrigsten getesteten Verdünnung von 95/5 % in der angereicherten Fraktion wiedergefunden werden. Für die höchste Verdünnung von 0,05 % Tumorzellen auf 99,95 % Leukozyten konnten nach der kürzesten Zeit bereits alle Tumorzellen (100 %) erfolgreich mit MNP beladen werden (Abb. 12 B). Durch die längeren Inkubationszeiten konnten für die Verdünnungen von 95/5 % und 99,5/0,5 % steigende Werte für den Anteil an Tumorzellen in der positiven Fraktion ermittelt werden (95/5 %: 4 min – 74 %, 8 min – 83 %, 12 min – 89 %; 99,5/0,5: 4 min – 82 %, 8 min – 88 %, 12 min – 95 %; 99,95/0,05: bereits nach 4 min – 100 %). Allerdings stieg gleichzeitig mit längerer Inkubationszeit der prozentuale Anteil der Leukozyten in der separierten Fraktion (Abb. 12 C). Während nach 4 min ca. 30 % der vorhandenen Leukozyten durch die CMD-umhüllten MNP magnetisch markiert wurden, so hat sich diese Zahl nach 8 min nahezu verdoppelt (57 % bis 63 %). Nach einer 12-minütigen Inkubation haben 61 % bis 84 % der Leukozyten mit den magnetischen Partikeln interagiert und befinden sich nach der Separation in der Positivfraktion. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass trotz höherer Verdünnung der Tumorzellen mit gesunden Leukozyten diese erfolgreich mittels CMD-umhüllten MNP innerhalb von 4 min magnetisch beladen wurden und die Sensitivität der Methode mit sinkender Zahl tumorverdächtiger Zellen zunimmt. Bei längeren Inkubationszeiten ist mit einer steigenden Aufnahmerate an Leukozyten zu rechnen, was sich wiederum negativ auf den Anreicherungsfaktor auswirkt (Tab. 14).

Tab. 14 Anreicherungsverhältnis und Anreicherungsfaktor nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.

Inkubationszeit [min]	<i>Anreicherungsverhältnis der Tumorzellen nach MACS-Separation</i>			<i>Anreicherungsfaktor der Tumorzellen nach MACS-Separation</i>		
	95/5	99,5/0,5	99,95/0,05	95/5	99,5/0,5	99,95/0,05
4	89,69/10,31	98,63/1,37	99,84/0,16	2,06	2,75	3,12
8	92,88/7,12	92,28/0,72	99,92/0,08	1,42	1,43	1,58
12	92,89/7,11	99,41/0,59	99,95/0,05	1,42	1,19	0,99

Um auch bei längeren Inkubationszeiten eine gute Anreicherungsrate der Tumorzellen gewährleisten zu können wurden Versuche mit humanem Plasma durchgeführt. Laut Schwalbe und Kollegen soll durch die Zugabe geringer Mengen an humanem Plasma (0,5 % bis 2,5 %) eine deutliche Reduktion der Leukozytenmarkierung erfolgen (Schwalbe et al., 2005). Für die Versuche wurden Blutproben von Patienten in Nachsorge gepoolt und für die Blutlyse eingesetzt. Die erhaltene Leukozytenfraktion wurde für 4 min mit CMD-umhüllten

MNP inkubiert und anschließend die magnetische Markierung der Leukozyten unter Zugabe verschiedener Konzentrationen humanen Plasmas (2,5 % bis 8 %) beeinträchtigt. Eine weiterführende Inkubation für 6 min sollte ein mögliches erfolgreiches Abstoppen der Nanopartikelaufnahme verdeutlichen. Nach der MACS-Separation wurden die Proben mit den fluoreszierenden Antikörpern markiert und mittels Durchflusszytometrie vermessen. Bereits bei dem Vergleich der prozentualen Verteilung der Zellen in den separierten Fraktionen war ein erfolgreiches Abstoppen der MNP-Aufnahme durch die Zellen zu erkennen (Abb. 13 A).

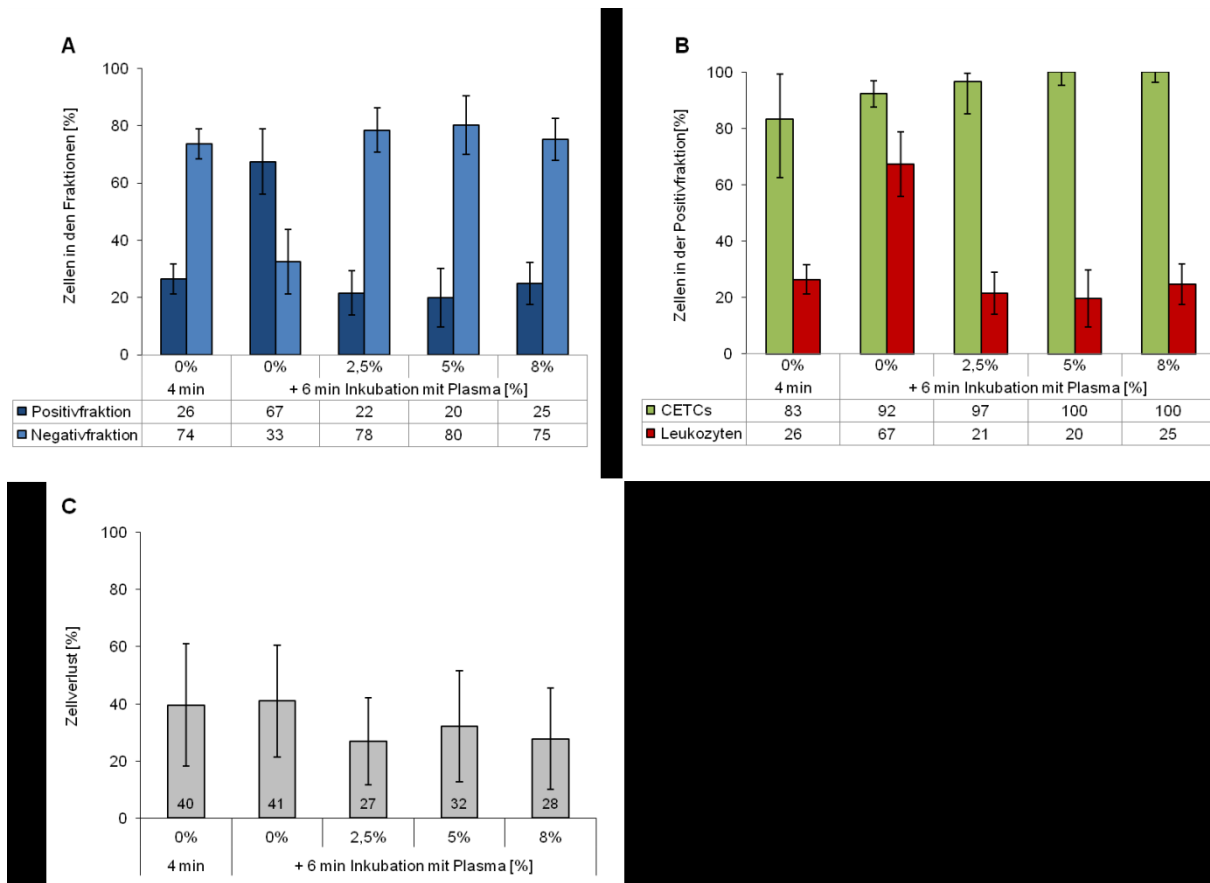


Abb. 13 Untersuchung verschiedener Plasmakonzentrationen auf das Aufnahmeverhalten von humanen Zellen (n=6).

(A) Zellzahlbestimmung in den separierten Fraktionen (bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation): durch die Zugabe von humanem Plasma konnte ein erfolgreiches Abstoppen der Nanopartikelinteraktion zu den Zellen erzielt werden. Eine Verlängerung der Inkubationszeit um weitere 6 min hatte keinen Einfluss auf die zusätzliche magnetische Markierung der hämatogenen Zellen. Lediglich die Probe, welcher kein humanes Plasma zugesetzt wurde zeigte mit 67 % einen dramatischen Zuwachs an Zellen in der Positivfraktion (PF). (B) Bestimmung des CETC- bzw. Leukozytenverhältnisses nach der Anreicherung in der PF (bezogen auf die CETC- bzw. Leukozytengesamtzahl nach der Separation): durch die Plasmazugabe konnte ein stabiler Wert für die Leukozytenmarkierung erzielt werden. Dagegen wurde die magnetische Beladung der tumorverdächtigen Zellen (CETCs) durch das humane Plasma nicht beeinträchtigt. Mindestens 83 % dieser Zellen lagen nach der Separation in der PF vor. (C) Bestimmung des auftretenden Zellverlustes (bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation): die Zugabe von humanem Plasma wirkt sich positiv auf den durch die MACS-Separation bedingten Zellverlust aus (≤ 32 % Zellverlust nach Inkubation mit Plasma).

Nach Zugabe des humanen Plasmas wurden trotz einer Verlängerung der Inkubationszeit um weitere 6 min keine zusätzlichen Zellen durch die CMD-umhüllten MNP markiert. Lediglich die Probe, der kein humanes Plasma zugesetzt wurde zeigte mit 67 % einen dramatischen Zuwachs an Zellen in der Positivfraktion. Ebenso zeigten die Ergebnisse für die Betrachtung der einzelnen Zelltypen in der separierten Fraktion durch die Plasmazugabe einen stabilen Wert für die Leukozytenmarkierung. Dagegen wurde die magnetische Beladung der CETCs durch das humane Plasma nicht beeinträchtigt. Während nach einer 4 min MNP-Inkubation 83 % der CETCs erfolgreich durch die CMD-umhüllten Partikel markiert wurden, konnte durch die anschließende 6-minütige Plasmabehandlung der Wert auf 97 % (bei 2,5 % Plasma) bzw. sogar auf 100 % (bei 5 % bzw. 8 % Plasma) gesteigert werden. Eine Zunahme der Plasmakonzentration scheint die magnetische Markierung der CETCs zu unterstützen (Abb. 13 B). Bei dem Vergleich der Zahlen bezüglich des Zellverlustes wirkte sich die Zugabe von humanem Plasma ebenfalls positiv auf die Vitalität der Zellen aus (ohne Plasma etwa 40 % Zellverlust, mit Plasma 27 % bis 32 % Zellverlust, Abb. 13 C).

Abschließend sollte getestet werden, ob die Zugabe des Plasmas gleichzeitig mit den Separationspartikeln erfolgen kann, um auf die 4-minütige Behandlung ohne Plasma verzichten zu können. Die Inkubationszeit der Proben mit den CMD-umhüllten MNP nach der Plasmazugabe wurde auf 10 min erhöht, um einen gleichbleibenden Versuchsaufbau zu gewährleisten. Auch hierfür wurden verschiedene Blutproben von Patienten in Nachsorge gemischt und der Versuch mehrmals durchgeführt. Nach der 10-minütigen Inkubation mit CMD-umhüllten Partikeln wurden die Proben separiert und durchflusszytometrisch vermessen.

Durch die gleichzeitige Zugabe von humanem Plasma und Nanopartikeln zu der zu separierenden Probe konnte eine sehr gute Anreicherungsrate der CETCs erzielt werden. Die Plasmabehandlung bewirkte eine selektivere Anreicherung der tumorverdächtigen Zellen. Nach der MACS-Separation mit Plasma wurden 11 % bis 16 % der eingesetzten Zellen durch die MNP magnetisch markiert und waren in der Positivfraktion zu finden (im Vergleich ohne Plasma: 67 %; Abb. 14 A). Die Betrachtung der Zelltypen in der Positivfraktion zeigte, dass durch die Plasmazugabe deutlich weniger Leukozyten in den 10 min mit den MNP interagierten (11 % bis 15 %) als ohne die Plasmabehandlung (67 %). Auch bei diesen Untersuchungen verbessert eine Zugabe von humanem Plasma die selektive Markierung der CETCs. In der angereicherten Fraktion konnten 88 % bis 96 % der vorhandenen CETCs

erfolgreich magnetisch markiert werden (Abb. 14 B). Ebenso begünstigte die Plasmazugabe eine Reduktion des Zellverlustes durch die MACS-Separation. Während ohne Plasma ein Zellverlust von 41 % zu verzeichnen war, konnte durch die Zugabe von beispielsweise 8 % Plasma die Verlustrate auf 23 % herabgesetzt werden (Abb. 14 C).

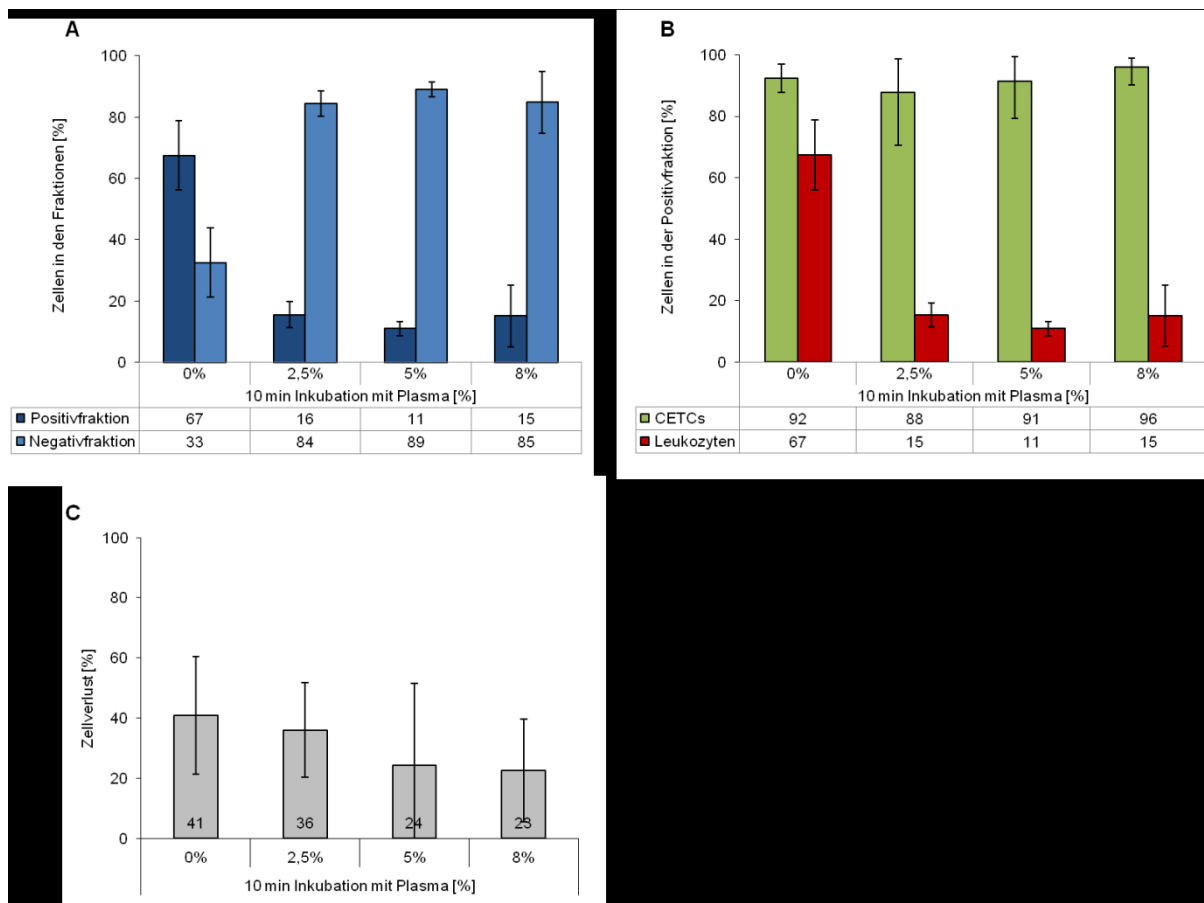


Abb. 14 Untersuchung verschiedener Plasmakonzentrationen auf das Aufnahmeverhalten von humanen Zellen (n=6).

(A) Zellzahlbestimmung in den separierten Fraktionen (bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation): durch die Zugabe von humanem Plasma konnte ein erfolgreiches Abstoppen der Nanopartikelinteraktion zu den Zellen erzielt werden. Nur die Probe ohne Inkubation mit humanem Plasma zeigte einen deutlichen Zuwachs an Zellen in der Positivfraktion (PF). (B) Bestimmung des CETC- bzw. Leukozytenverhältnisses nach der Anreicherung in der PF (bezogen auf die CETC- bzw. Leukozytengesamtzahl nach der Separation): eine Zugabe von humanem Plasma zur Nanopartikelinkubation ergab eine schwache Leukozytenmarkierung, während die sehr gute magnetische Beladung der tumorverdächtigen Zellen (mind. 88 % CETCs) dadurch nicht beeinträchtigt wurde. (C) Bestimmung des auftretenden Zellverlustes (bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation): durch die Plasmazugabe konnte ein schwächerer Zellverlust erzielt werden.

Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine Umwandlung des herkömmlichen CMD zur Säureform (CMD-H) für die Anreicherung der CETCs unterstützend wirkt und daher auch für die weiterführenden Versuche verwendet wurde. Von einer Abänderung des carboxymethylierten Polysaccharides Dextran zu Cellulose oder Pullulan wurde dagegen Abstand genommen, da diese mit einer erhöhten magnetischen

Markierung der Leukozyten einhergeht. Dagegen setzte die Zugabe von humanem Plasma die Interaktion von MNP und Leukozyten herab und unterstützte eine selektive Anreicherung der CETCs. Da bereits nach einer 4-minütigen Kurzzeitinkubation der Zellen mit MNP@CMD eine sehr gute CETC-Anreicherung ohne humanes Plasma erzielt werden konnte (siehe beispielsweise Abb. 13 B), wurde bei den nachfolgenden Separationsversuchen der Patienten auf die Zugabe verzichtet. Zusätzlich haben die Versuche zur Sensitivität gezeigt, dass trotz höherer Verdünnung der Tumorzellen bei einer 4-minütigen Nanopartikelinkubation eine zunehmende magnetische Markierung der CETCs mit ansteigender Verdünnung erfolgte. Durch die nahezu gleichbleibende Beladung der Leukozyten konnte ein verstärkender Anreicherungseffekt der tumorverdächtigen Zellen erzielt werden.

4.1.2 Therapieabhängiger Anreicherungseffekt zirkulierender epithelialer Zellen

Nach der Optimierung der Separationsmethode an Zellkulturen sowie Verdünnungsversuchen wurde der Anreicherungseffekt der tumorverdächtigen zirkulierenden epithelialen Zellen (CETCs; *circulating epithelial tumor cells*) von Mammakarzinompatienten zu verschiedenen Therapiezeitpunkten untersucht. Hierfür wurde das Interaktionsverhalten der in der Probe vorliegenden CETCs zu carboxymethylierten Dextran- (CMD) umhüllten Nanopartikeln überprüft. Die Proben wurden dafür nach dem beschriebenen Versuchsablauf (Abb. 15) aufgearbeitet.

Für jede zu separierende Probe wurde ein 1 ml Vollblut verwendet und nach der Lyse der Erythrozyten die MACS-Separation durchgeführt. Nach der Bestimmung der Zellzahlen in den einzelnen Fraktionen folgte die Färbung der Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern. Für die Differenzierung zwischen den Zelltypen wurden der PE-gelabelte Antikörper gegen den Leukozytenmarker CD45 und der FITC-gelabelt Antikörper gegen EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*;) verwendet. Vergleichend wurde immer ein Teil der Probe nicht-separiert mitgeführt. Zunächst wurden 390 Vollblutproben von Mammakarzinompatienten (insgesamt 160 Patientinnen) zu verschiedenen Therapiezeitpunkten auf einen möglichen Anreicherungseffekt der vorhandenen CETCs untersucht. Durch weiterführende Analyseverfahren, wie Laser Scanning Cytometry (LSC) oder Durchflusszytometrie, konnte eine genaue Bestimmung des Anreicherungsfaktors erfolgen. Später wurde eine prospektive Gruppe von Patienten (68 Blutproben von insgesamt 7 Mammakarzinompatientinnen) im Laufe einer Chemotherapie von vor Beginn der Behandlung bis nach Abschluss der Therapie

auf eine mögliche Anreicherung untersucht. Die Fluoreszenzfärbung der Zellen wurde hierfür mit einem Alexa Fluor 488-gekoppelt Antikörper gegen EpCAM durchgeführt und zusätzlich die Vitalität der Zellen durch Propidiumiodid geprüft. Die Quantifizierung der zirkulierenden tumorverdächtigen epithelialen Zellen erfolgte über ein Laser-Scanning-Mikroskop (LSM bzw. AVISO-CellCelector) und durchflusszytometrische Analysen.

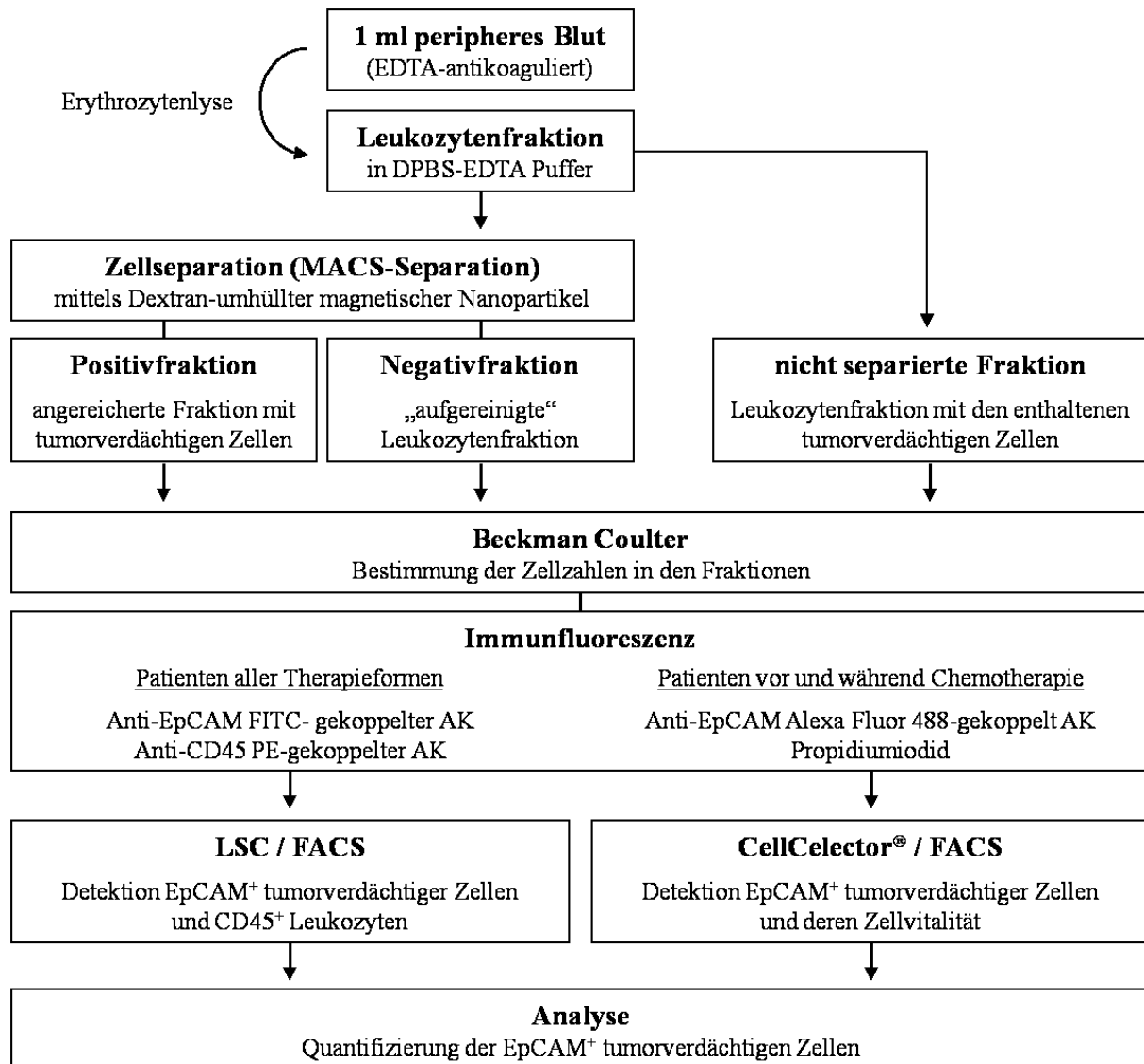


Abb. 15 Versuchsprotokoll zur Untersuchung des therapieabhängigen Anreicherungseffektes tumorverdächtiger Zellen und anschließenden Analysenverfahren.
(AK – Antikörper; EpCAM - *epithelial cell adhesion molecule*; FACS - *fluorescence activated cell sorting*; LSC – *laser scanning cytometry*; MACS - *magnetic activated cell sorting*)

Über die mikroskopgestützte LSM-Methode war ein möglicher Anreicherungseffekt der zirkulierenden tumorverdächtigen Zellen nachweisbar. Dafür wurden die Proben auf einen Glasobjektträger aufgetragen, welcher mit Hilfe des automatisierten Systems auf EpCAM⁺ Events analysiert wurde. Jedes detektierte und erfasste Ereignis wurde anschließend auf ihre

Richtigkeit ausgewertet und der prozentuale Anteil der CETCs in den einzelnen Fraktionen vor und nach der MACS-Separationsmethode bestimmt. Schon bei Betrachtung der mikroskopischen Aufnahmen ist eine Anreicherung ersichtlich, welche auf die erhöhte Interaktionsrate der tumorverdächtigen Zellen mit den CMD-umhüllten Partikeln zurückzuführen ist (Abb. 16). Während in der unseparierten Probe vor der Anreicherung nur einzelne EpCAM⁺ Zellen auf viele EpCAM⁻ Leukozyten zu finden waren, konnte in der angereicherten Fraktion nach der MACS-Separation deutlich mehr EpCAM⁺ Events nachgewiesen werden. Zusätzlich war der Anteil an Leukozyten in der positiven Fraktion klar reduziert. Der bedeutend größere Anteil der Leukozyten lag nach der Separationsmethode magnetisch nicht-markiert in der Negativfraktion vor. Die erfolgreiche Abtrennung der seltenen CETCs von den im Überschuss vorliegenden Leukozyten ist eindeutig erkennbar.

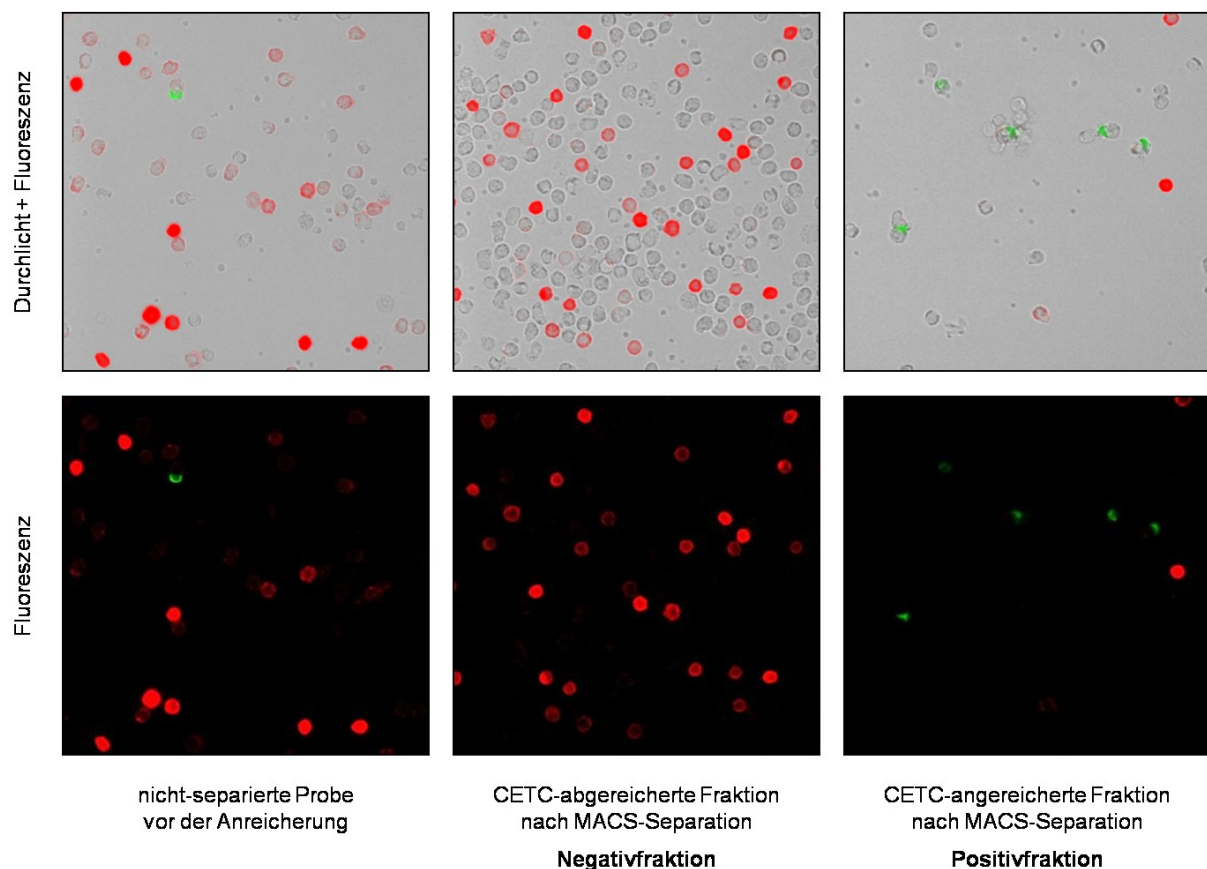


Abb. 16 Mikroskopische Aufnahmen (40x) zur Darstellung des Anreicherungs-effektes EpCAM⁺ tumorverdächtiger Zellen nach der MACS-Separation.

Eine nicht-separierte Probe vor der Anreicherung, behandelt mit Anti-EpCAM-FITC (grün, epithelialer Oberflächenmarker) und Anti-CD45-PE (rot, Oberflächenmarker für Leukozyten), zeigte nur einzelne EpCAM⁺ Zellen auf viele EpCAM⁻ Leukozyten. Dagegen konnte in der magnetisch angereicherten Fraktion nach der MACS-Separation deutlich mehr EpCAM⁺ Events nachgewiesen werden. Zusätzlich war der Anteil an Leukozyten in der positiven Fraktion deutlich reduziert. Der größere Anteil der EpCAM⁺ hämatogen Zellen lag magnetisch nicht-markiert in der Negativfraktion vor. Die erfolgreiche Abtrennung der seltenen tumorverdächtigen Zellen (CETCs) von den im Überschuss vorliegenden Leukozyten ist eindeutig erkennbar.

Unterstützend sowie vergleichend wurde zusätzlich ein durchflusszytometrisches Verfahren zum Nachweis der EpCAM⁺ Zellen eingesetzt. Die fluoreszenzmarkierten Proben wurden am FACS-Calibur™ durchflusszytometrisch vermessen und die EpCAM Events gegen die Fluoreszenzsignale von CD45 im Dotplot (Abb. 17) dargestellt. Daraus konnte die prozentuale Verteilung der EpCAM⁺ Zellen in den einzelnen Fraktionen ermittelt werden. Auch hierbei konnte der positive Effekt einer Anreicherung mittels CMD-umhüllter Magnetpartikel deutlich nachgewiesen werden. Während in der unbehandelten Fraktion nur ein sehr geringer prozentualer Anteil der dargestellten Events als EpCAM⁺ Zellen aufgezeigt werden konnte, war nach der MACS-Separation in der angereicherten Fraktion eine deutliche Zunahme der EpCAM⁺ Ereignisse im rechten Bereich des Dotplots ersichtlich.

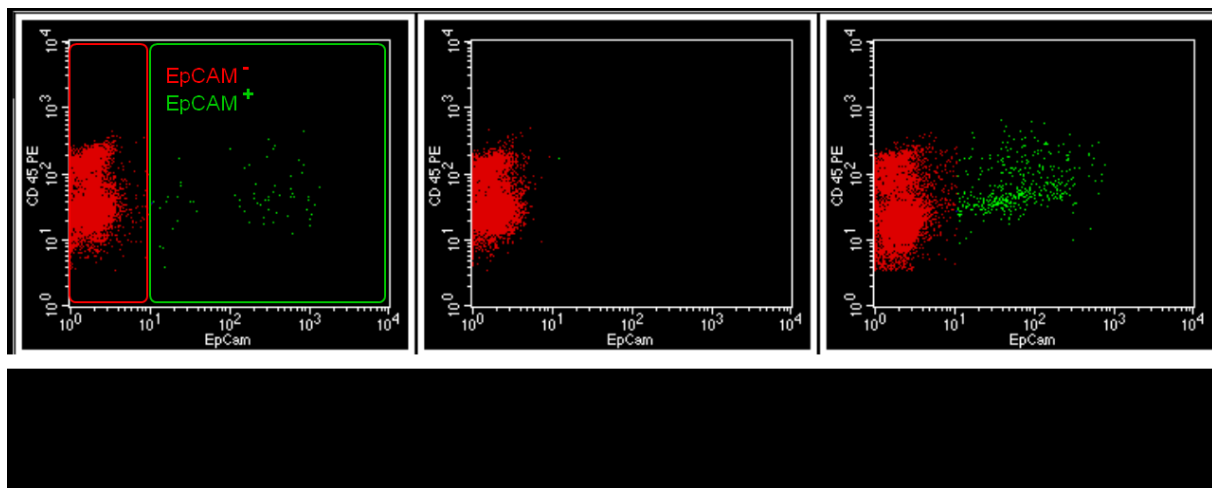


Abb. 17 FACS-Analysen zur Darstellung des Anreicherungseffektes tumorverdächtiger Zellen nach der MACS-Separation.

Die durchflusszytometrischen Analysen zeigten die erfolgreiche Anreicherung der tumorverdächtigen EpCAM⁺ Zellen (CETCs) in der Positivfraktion. Während eine nicht-separierte Probe vor der Anreicherung nur einzelne EpCAM⁺ Zellen im rechten Bereich des Dotplots (grün) auf viele EpCAM⁻ Leukozyten (rot) im linken Bereich zeigte, konnte in der magnetisch CETC-angereicherten Fraktion nach der MACS-Separation deutlich mehr EpCAM⁺ Ereignisse nachgewiesen werden. Dagegen zeigte die Negativfraktion fast ausschließlich EpCAM⁻ Events.

Durch Bestimmung der Zellzahlen in den einzelnen Fraktionen und die erhaltenen prozentualen Anteile der Leukozyten sowie der tumorverdächtigen Zellen in den separierten Proben konnte die Zusammensetzung dieser genau bestimmt werden. Im Median wurden 11 % aller Zellen durch die umhüllten Nanopartikel magnetisch markiert und befanden sich nach der Separation in der positiven Fraktion, 89 % der Zellen wurden nicht beladen (Abb. 18 A). Bei genauer Betrachtung der Zelltypenverteilung in den einzelnen Fraktionen konnten 80 % der vorliegenden CETCs in der Positivfraktion angereichert werden. Bezogen auf die Gesamtleukozytenzahl nach der Separation interagierten nur knapp 11 % der

Leukozyten ebenfalls mit den magnetischen Partikeln (Abb. 18 B). Somit wurden etwa 89 % der Leukozyten erfolgreich von den tumorverdächtigen Zellen abgetrennt. Der Zellverlust der MACS-Separationsmethode lag bei den 390 untersuchten Proben im Median bei 16 % (Abb. 18 C).

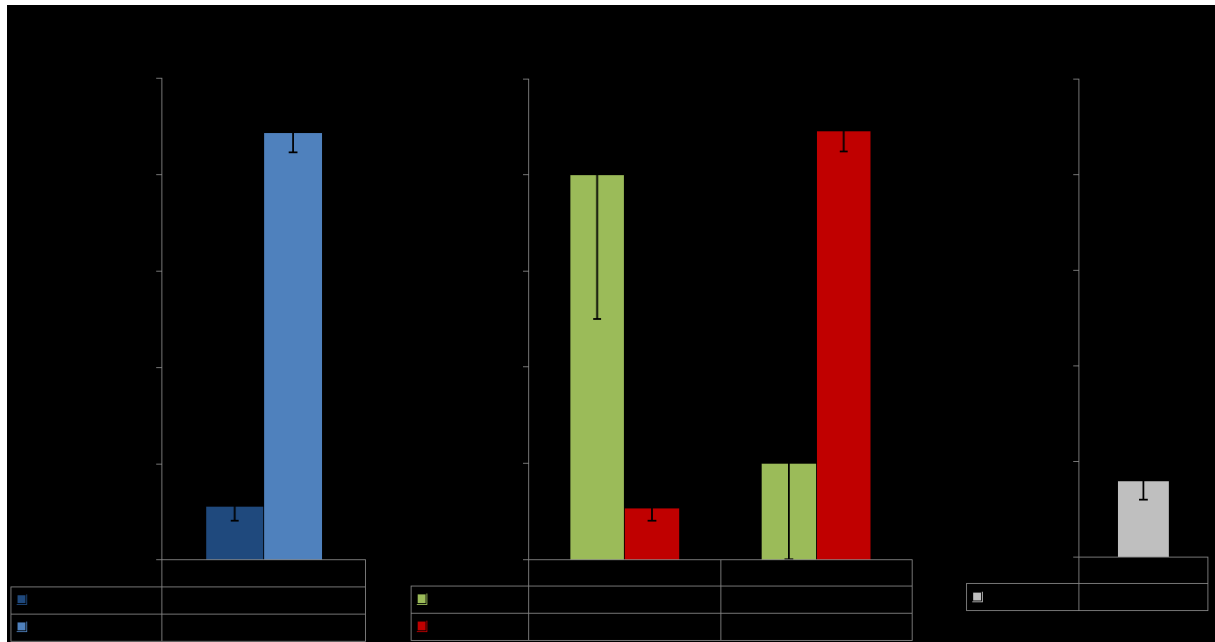


Abb. 18 MACS-Separation an Vollblutproben von Mammakarzinompatienten (n=390).

(A) Zellzahlbestimmung in den separierten Fraktionen (bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation): im Median wurden 11 % der Zellen durch Nanopartikel magnetisch markiert und befanden sich nach der Separation in der positiven Fraktion (PF). Der größere Anteil der Zellen (89 %) zeigte keine magnetischen Wechselwirkungen zu den Partikeln und lag in der Negativfraktion (NF) vor. **(B)** Bestimmung des CETC- bzw. Leukozytenverhältnisses nach der Anreicherung in den separierten Fraktionen (bezogen auf die CETC- bzw. Leukozytengesamtzahl nach der Separation): bei Betrachtung der Zelltypenverteilung in den einzelnen Fraktionen konnten 80 % der vorliegenden tumorverdächtigen Zellen (CETCs) in der PF angereichert werden. Nur knapp 11 % der Leukozyten interagierten ebenfalls mit den magnetischen Partikeln. Etwa 89 % der Leukozyten wurden erfolgreich von den CETCs abgetrennt. **(C)** Bestimmung des auftretenden Zellverlustes (bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation): im Median lag der Zellverlust bei 16 %.

Die Darstellung der prozentualen Anteile EpCAM⁺ tumorverdächtiger Zellen der einzelnen Patientenproben in der Positivfraktion zeigte eine große Divergenz der Proben untereinander auf (Abb. 19). Dennoch konnte für 77 % der Fälle (300 von 390 Proben) eine ausreichende magnetische Markierung mit Hilfe der CMD-umhüllten Partikel für mehr als 50 % der vorhandenen CETCs in der positiven Fraktion erzielt werden. In mehr als 100 Fällen (101 von 390 Proben, 26 %) konnte sogar eine komplette magnetische Markierung der zirkulierenden epithelialen Zellen erreicht werden, während für lediglich 3 % der getesteten Patientenproben (12 von 390 Proben) keine einzige tumorverdächtige Zelle aus einem ml Patientenblut mit den umhüllten Nanopartikeln interagierte. Dagegen lag die magnetische Markierung der Leukozyten für alle getesteten Proben bei sehr konstanten 11 %.

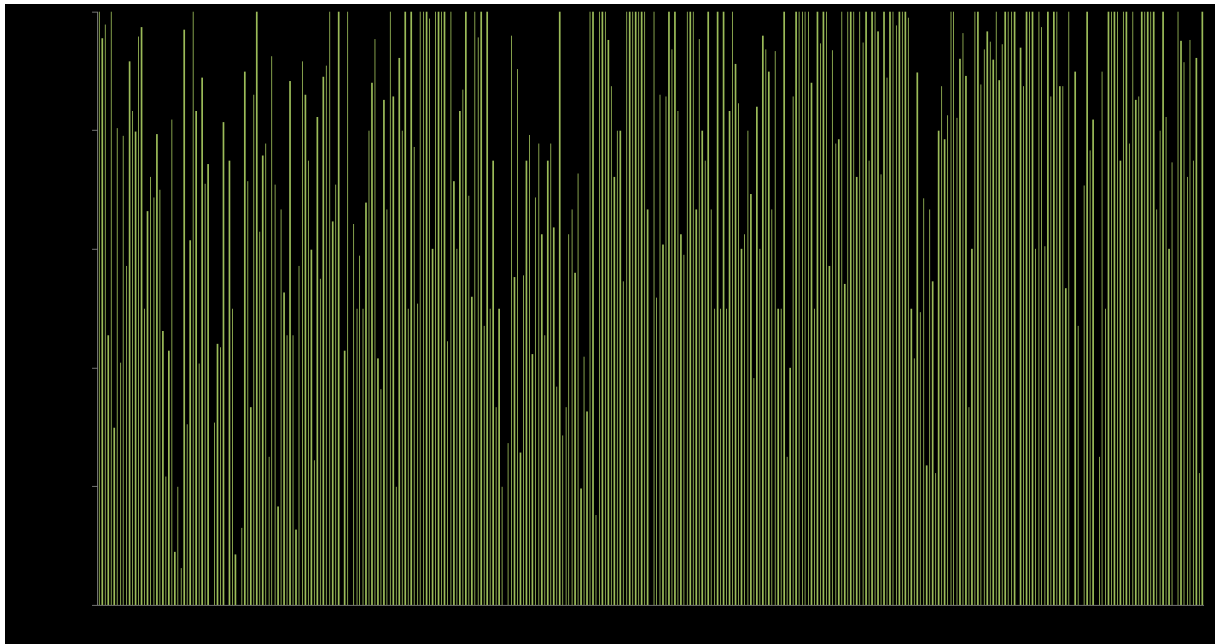


Abb. 19 Prozentuale Anteile EpCAM⁺ tumorverdächtiger Zellen der einzelnen Patientenproben in der Positivfraktion (n=390).

Bei der einzelnen Aufführung der detektierten zirkulierenden epithelialen Zellen (CETCs) in der anreicherten Fraktion konnte eine große Divergenz der Proben untereinander aufgezeigt werden. In mehr als 100 Fällen (101 von 390 Proben, 26 %) konnte eine komplette magnetische Markierung der CETCs erreicht werden. Nur 3 % der getesteten Patientenproben (12 von 390 Proben) zeigte keine Interaktion der vorhandenen CETCs mit den magnetischen Partikeln.

Nachdem die Separationsergebnisse der Patienten nach ihrer jeweiligen Therapiesituation zum Zeitpunkt der Blutentnahme gruppiert wurden, konnte eine therapieabhängige Anreicherung der CETCs in der Positivfraktion beobachtet werden (Abb. 20). Während bei den Blutproben der Patienten unmittelbar vor der operativen Entfernung des Tumors eine sehr gute Nanopartikelmarkierung der tumorverdächtigen Zellen erfolgte (100 % der CETCs in der Positivfraktion), zeigten die CETCs der Patienten, welche sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in einer Chemotherapie befanden, mit nur 54 % eine wesentlich schlechtere Interaktion zu den umhüllten MNP. Die CETCs von Patienten vor sowie nach einer Bestrahlung zeigten eine ebenso gute Interaktionsrate mit den Nanopartikeln von mehr als 80 % wie die Patienten in Behandlung mit Trastuzumab und Zoledronsäure oder in Nachsorge. Dagegen blieb die magnetische Markierung der Leukozyten von der Therapie unberührt. Nur 9 bis 12 % der vorhandenen Leukozyten wurden durch die CMD umhüllten Partikel beladen und befanden sich nach der MACS-Separation ebenfalls in der angereicherten Fraktion (Abb. 20 B). Bei Betrachtung der Gesamtzellzahlen in den einzelnen Fraktionen konnte ebenfalls kein Einfluss durch die jeweilige Therapie festgestellt werden. Mehr als 88 % der Zellen wurden nicht durch die Nanopartikel magnetisch markiert und nur

10 % bis maximal 12 % der vorhandenen Zellen befanden sich nach der magnetischen Markierung mit den umhüllten Nanopartikeln in der positiven Fraktion (Abb. 20 A).

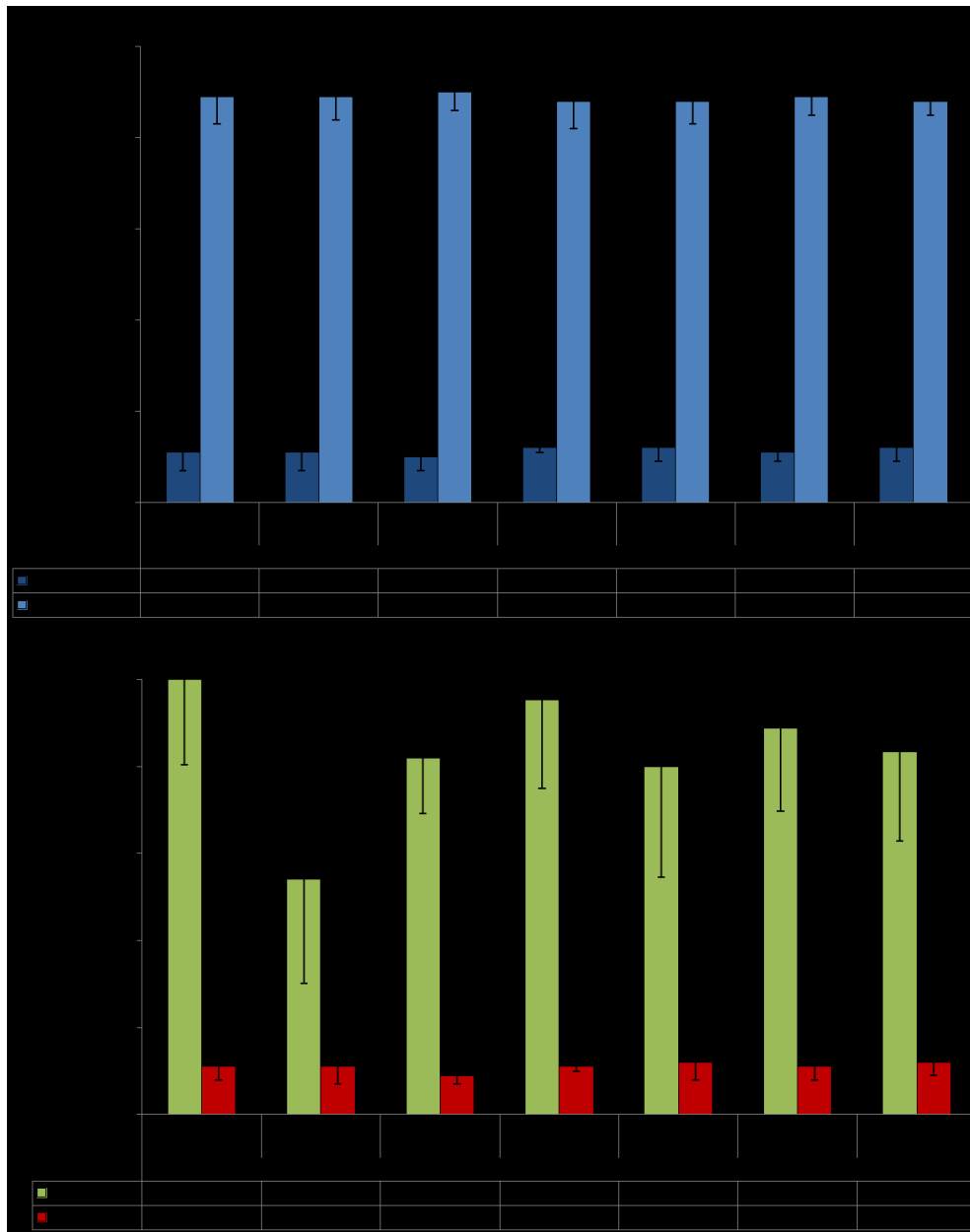


Abb. 20 Therapieabhängige Anreicherung der tumorverdächtigen Zellen in der separierten Positivfraktion. **(A)** Zellzahlbestimmung in den separierten Fraktionen (bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation): unabhängig von der jeweiligen Therapie wurden mehr als 88 % der Zellen nicht durch die Nanopartikel magnetisch markiert. Maximal 12 % der Zellen befanden sich nach der magnetischen Markierung mit den Nanopartikeln in der positiven Fraktion (PF). Es konnte kein Einfluss durch die jeweilige Therapie festgestellt werden. **(B)** Bestimmung des CETC- bzw. Leukozytenverhältnisses nach der Anreicherung in der PF (bezogen auf die CETC- bzw. Leukozytengesamtzahl nach der Separation): die Blutproben der Patienten unmittelbar vor der operativen Entfernung des Tumors zeigten eine sehr gute Nanopartikelmarkierung der tumorverdächtigen Zellen (100 % der CETCs in der PF). Zusätzlich konnte für die Patientengruppen in Behandlung mit Trastuzumab oder Zoledronsäure, als auch für die Patienten in Nachsorge sowie vor und nach Bestrahlungstherapie eine gute Anreicherung der CETCs in der PF (mind. 80 %) erzielt werden. Lediglich die CETCs in den Proben der Patienten, welche sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in einer Chemotherapie befanden, zeigten mit nur 54 % eine wesentlich schlechtere Interaktion zu den magnetischen Partikeln. Maximal 12 % der Leukozyten interagierten ebenfalls mit den magnetischen Partikeln, d.h. mehr als 88 % der Leukozyten wurden erfolgreich von den CETCs abgetrennt.

Einige Proben (71 von 390) konnten nicht in die Auswertung der einzelnen Therapiegruppen aufgenommen werden. Da diese beispielsweise bei Kombination einer Chemotherapie mit einer Hormontherapie nicht eindeutig einer Therapiegruppe zugeordnet werden konnten, wurde auf die Darstellung dieser Ergebnisse verzichtet.

Wird in die Betrachtung der Anreicherung die Gesamtzellzahl der jeweiligen Fraktion mit einbezogen, dann lässt sich eine Aussage über den prozentualen Anteil der CETCs zur Gesamtzellzahl treffen. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden in Form eines Boxplots dargestellt und mögliche signifikante Abweichungen mit dem parameterfreien statistischen Mann-Whitney-U Test ermittelt (Abb. 21).

Der prozentuale Anteil der CETCs lag bei allen Therapieformen vor der Anreicherung bei 0,08 % bis 0,22 % und konnte jeweils für alle untersuchten Gruppen durch die MACS-Anreicherung erhöht werden. Für nahezu alle Therapiegruppen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten vor und nach der Anreicherung ermittelt werden ($p \leq 0,007$). Dagegen konnte durch die magnetische Separation keine charakteristische Abweichung bei den Blutproben der Patienten nach einer Strahlentherapie nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil der CETCs vor der Anreicherung lag mit 0,02 % bei den Proben der Patienten in Chemotherapie am niedrigsten. Zu allen anderen untersuchten Formen der Krebstherapie vor der MACS-Separation konnte eine statistische Signifikanz ermittelt werden ($p \leq 0,034$). Dabei zeigte sich für die Blutproben der Patienten vor einer operativen Entfernung des Tumors und für die Proben vor, als auch nach der Strahlentherapie, ein signifikanter Unterschied auf (vor OP: $p = 0,034$; vor Radiatio: $p = 0,022$; nach Radiatio: $p = 0,012$). Zusätzlich war die Signifikanz zu den Patienten in den Gruppen Trastuzumab, Zoledronsäure und Nachsorge am deutlichsten ($p = 0,001$). Außerdem konnte für diese drei Therapieformen auch nach der MACS-Separation eine charakteristische Abweichung zur Chemotherapie ermittelt werden (Trastuzumab: $p = 0,036$; Zoledronsäure: $p = 0,000$; Nachsorge: $p = 0,003$). Des Weiteren wurden nach der Anreicherung signifikante Unterschiede zwischen den Therapien Zoledronsäure zu Trastuzumab ($p = 0,014$) als auch zu der Patientengruppe vor OP ($p = 0,008$) bewiesen. Bei Betrachtung des nachfolgenden Diagramms zeigte sich, dass für die Therapieformen Trastuzumab, Zoledronsäure und Nachsorge die Ausreißer mit dem höchsten Anreicherungs-effektes nach der Separation ermittelt werden konnten.

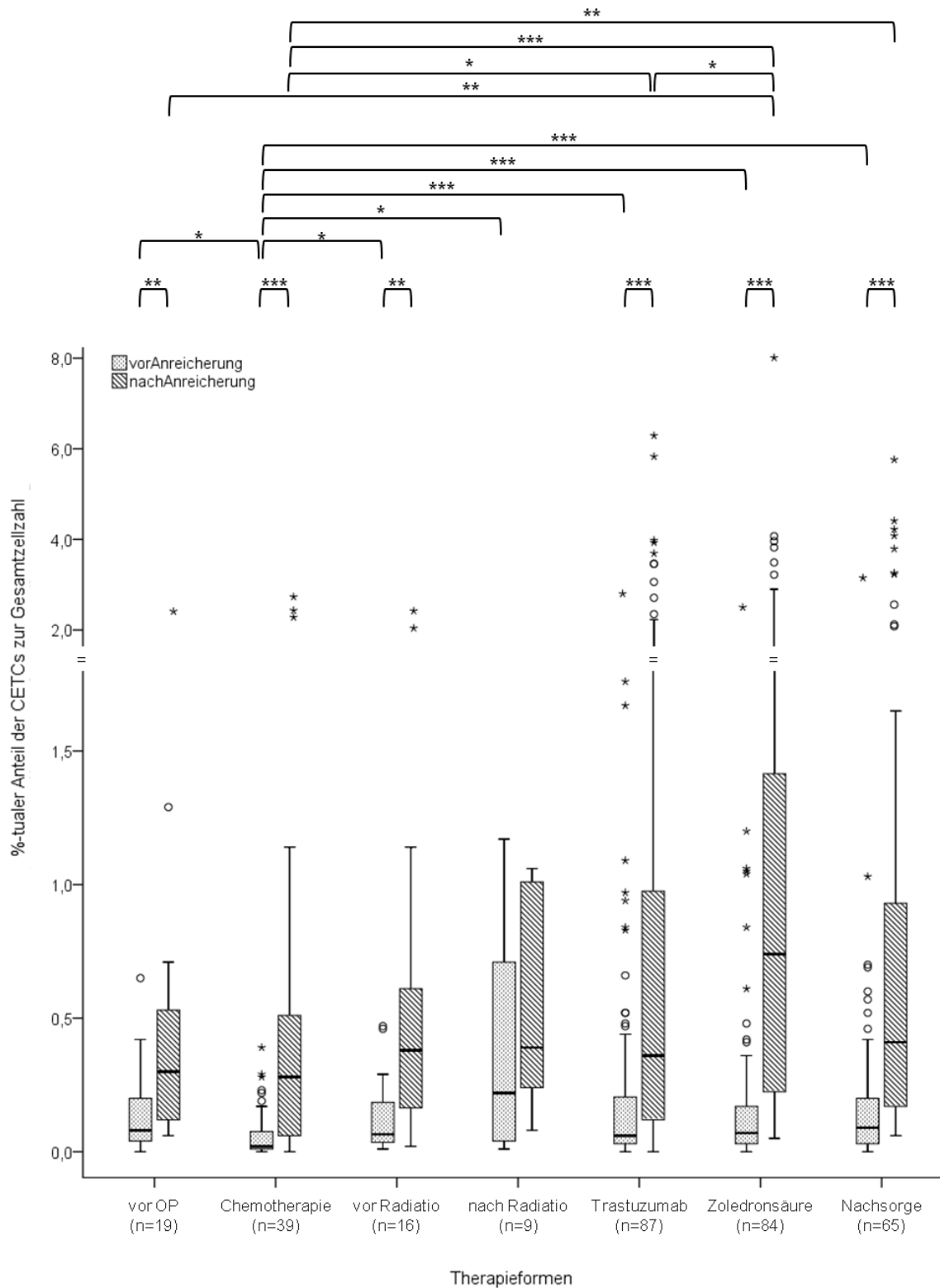


Abb. 21 Darstellung des prozentualen Anteils tumorverdächtiger Zellen vor sowie nach der MACS-Separation von Patienten in verschiedenen Therapiezuständen.

Für die einzelnen Therapieformen konnte in allen Fällen eine Steigerung des prozentualen Anteils der tumorverdächtigen Zellen (CETCs) zur Gesamtzellzahl durch die Separation erzielt werden. Zusätzlich konnte für fast alle Gruppen ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,007$) zwischen den Werten vor und nach der Anreicherung nachgewiesen werden. Speziell die Chemotherapie zeigte vor sowie nach der Anreicherung einige Signifikanzen anderen Therapieformen gegenüber ($p \leq 0,036$). Die im Diagramm abgebildeten signifikanten Abweichungen wurden mit dem parameterfreien statistischen Mann-Whitney U Test ermittelt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Aus den erhaltenen prozentualen Anteilen der CETCs nach der MACS-Separation zu den Werten vor der Anreicherung konnte der jeweilige Anreicherungsfaktor bestimmt werden. Eine sehr gute Anreicherung der CETCs mittels CMD-umhüllter Nanopartikel um mehr als das Siebenfache konnte in Vollblutproben von Mammakarzinompatienten in einer Nachbehandlung mit Bisphosphanaten erzielt werden. Die Proben der Patienten vor der operativen Entfernung des Tumors, unter Chemotherapie oder in Nachsorge zeigten, wie die Patienten vor einer Bestrahlung, mit einem 4- bis 5-fachen Anreicherungsfaktor eine gute Anreicherung der tumorverdächtigen Zellen in der positiven Fraktion. Dagegen offenbarten die Blutproben der Patienten unter Hormontherapie mit 2,96 eine relativ schwache Anreicherung der tumorverdächtigen Zellen in der Positivfraktion. Die separierten Blutproben der Patienten, die nach der Strahlentherapie abgenommen wurden, wiesen den niedrigsten Anreicherungseffekt auf. Hier lag der Anteil der tumorverdächtigen Zellen gegenüber der Gesamtzellzahl in einem ml Blut vor der Anreicherung bereits bei 0,22 %. Dieser auffällige Wert lässt sich auf den kleinen medianen Wert der Gesamtzellzahl in einem ml Blut und auf die verhältnismäßige hohe Anzahl von tumorverdächtigen Zellen in der nicht-separierten Fraktion zurückführen. Da nach der MACS-Separation mit 0,39 % ein ähnlicher prozentualer Anteil an CETCs zur Gesamtzellzahl in der positiven Fraktion vorlag wie bei nahezu allen Therapieformen, fiel der Anreicherungsfaktor mit nur 2,17 verhältnismäßig gering aus. Bei den in der Tab. 15 aufgeführten Werten zu Zellzahlen vor sowie nach der MACS-Separation und den Anreicherungsfaktoren handelt es sich um mediane Patientenwerte.

Tab. 15 Medianer therapieabhängiger Anreicherungsfaktor der tumorverdächtigen Zellen in der separierten Positivfraktion.

	<i>Nicht-separierte Fraktion vor der Anreicherung</i>			<i>Angereicherte Fraktion nach MACS-Separation</i>			<i>\bar{x} Anreicherungs- faktor [%]</i>
	Gesamtzell- zahl pro ml Blut \bar{x}	CETC- Zellzahl pro ml Blut \bar{x}	% \bar{x}	Gesamtzell- zahl in der PF \bar{x}	CETC- Zellzahl in der PF \bar{x}	% \bar{x}	
alle Therapieformen (n=390)	3.987.000	3.600	0,08	216.800	800	0,39	4,24
vor OP (n=19)	3.349.500	3.200	0,08	185.600	400	0,30	4,27
Chemotherapie (n=39)	3.677.750	1.800	0,02	224.000	500	0,28	4,44
vor Radiatio (n=16)	4.336.000	2.900	0,06	251.200	900	0,38	4,93
nach Radiatio (n=9)	3.425.500	5.000	0,22	257.600	1.000	0,39	2,17
Trastuzumab (n=87)	3.853.000	4.600	0,08	203.200	700	0,36	2,96
Zoledronsäure (n=84)	4.160.500	5.200	0,11	217.200	1.350	0,74	7,22
Nachsorge (n=65)	4.517.500	5.000	0,12	216.000	1.100	0,41	3,73

(PF – Positivfraktion, \bar{x} – medianer Wert)

Die Strahlentherapie war mit einer drastischen Erhöhung der Anzahl an CETCs im Vollblut der Patienten assoziiert. Während durch die Therapie die Gesamtzellzahl pro ml Blut um mehr als 20 % abfiel (vor Radiatio: $4,336 \times 10^6$ Zellen/ml; nach Radiatio: $3,426 \times 10^6$ Zellen/ml), stieg der prozentuale Anteil der CETCs gegenüber der Gesamtzellzahl um mehr als das Dreifache an (vor Radiatio: 0,06 %; nach Radiatio: 0,22 %). In der angereicherten Fraktion nach der MACS-Separation war im Vergleich dazu kein bedeutungsvoller Unterschied ersichtlich. Sowohl die Zellzahlen als auch die Anzahl der CETCs in der Positivfraktion unterschied sich nicht auffallend. Die deutliche Abnahme des Anreicherungsfaktors durch die Strahlentherapie, um mehr als die Hälfte, ist demzufolge auf den eindeutigen Anstieg der CETC-Zahl dieser Patienten zurück zu führen. Sowohl diese Beobachtung als auch die verbesserte Aufnahme rate der CMD Partikel durch die CETCs konnte ebenfalls bei der Betrachtung einzelner Patienten im Verlauf ihrer Behandlung beobachtet werden (Tab. 16).

Tab. 16 Medianer Anreicherungsfaktor der tumorverdächtigen Zellen in der separierten Positivfraktion vor und nach der Strahlentherapie sowie am Patientenbeispiel.

		<i>Nicht-separierte Fraktion vor der Anreicherung</i>			<i>Angereicherte Fraktion nach MACS-Separation</i>			<i>̄x Anreicherungs- faktor [%]</i>	<i>CETC-Verteilung nach Separation (̄x PF / ̄x NF) [%]</i>
		Gesamtzell- zahl pro ml Blut ̄x	CETC- Zellzahl pro ml Blut ̄x	% ̄x	Gesamtzell- zahl in der PF ̄x	CETC- Zellzahl in der PF ̄x	% ̄x		
Gesamt (n=25)	vor Radiatio	4.336.000	2.900	0,06	251.200	900	0,38	4,93	82/18
	nach Radiatio	3.425.500	5.000	0,22	257.600	1.000	0,39	2,17	95/5
Pat. SG	vor Radiatio	5.415.000	1.876	0,03	361.600	1.000	0,28	7,98	42/58
	nach Radiatio	3.993.000	11.400	0,29	228.000	2.300	1,01	3,53	61/39
Pat. WR	vor Radiatio	13.515.000	11.400	0,08	395.200	900	0,23	2,70	90/10
	nach Radiatio	3.425.500	40.186	1,17	257.600	1.000	0,39	0,33	100/0

(PF – Positivfraktion; NF – Negativfraktion; ̄x – medianer Wert)

Bei genauerer Betrachtung der Patienten unter Chemotherapie konnten einzelne Unterschiede, abhängig von der Chemotherapeutikakombination des Patienten, festgestellt werden. Mit Taxan therapierte Patienten zeigten für die vorhandenen tumorverdächtigen Zellen eine bessere Interaktionsrate mit den umhüllten magnetischen Nanopartikel (62 % bis 63 %), als Patienten welche eine Kombinationstherapie erhielten (FEC - Fluorouracil/ Epidoxorubicin/ Cyclophosphamid: 50 %; EC - Epidoxorubicin/ Cyclophosphamid: 40 %; Abb. 22). Die Aufnahme der Partikel durch die Leukozyten schwankte von 7 % bis max. 14 %.

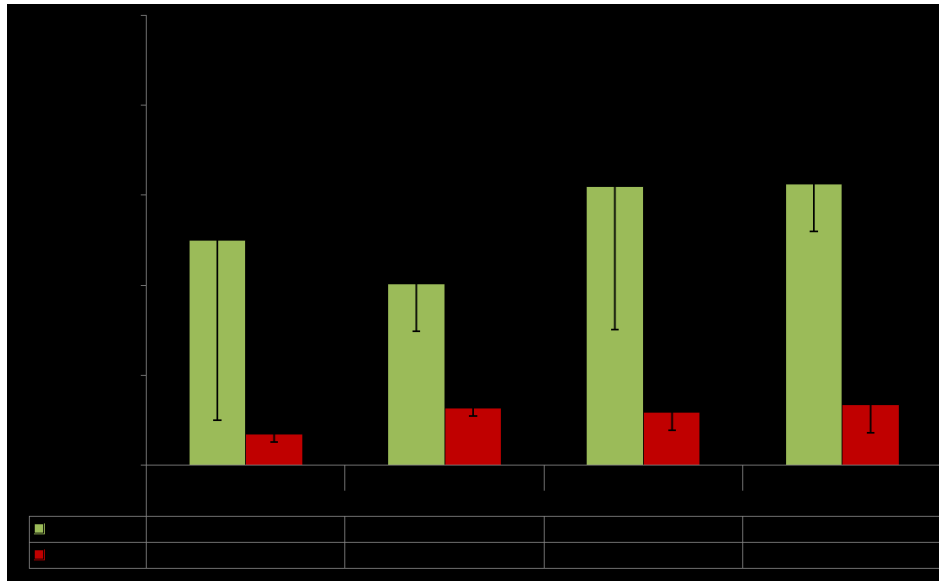


Abb. 22 Verteilung der Zelltypen in der Positivfraktion nach der MACS-Separation von Patientenproben während unterschiedlicher Zytostatikabehandlungen.

Bezogen auf die CETC-Gesamtzellzahl nach der Separation zeigten die mit Taxan therapierten Patienten für die tumorverdächtigen Zellen (CETCs) eine bessere Interaktionsrate mit den magnetischen Nanopartikel (62 % bis 63 %), als Patienten welche eine Kombinationstherapie erhielten (FEC - Fluorouracil/ Epidoxorubicin/ Cyclophosphamid; EC - Epidoxorubicin/ Cyclophosphamid). Die magnetische Beladung der Leukozyten lag bei max. 14 %.

Wurde in die Untersuchungen die Gesamtzellzahl der jeweiligen Fraktion mit einbezogen, so zeigten sich auch hier starke Unterschiede bei der Betrachtung des Anreicherungsfaktors, welche abhängig von der jeweiligen Behandlung waren (Abb. 23). Für alle untersuchten Formen der Chemotherapie konnte eine Steigerung des prozentualen Anteils der CETCs zur Gesamtzellzahl durch die MACS-Separation erzielt werden. Zusätzlich zeigten fast alle Gruppen einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten des CETC-Anteils vor und nach der Anreicherung ($p \leq 0,015$). Wiederholt weisen Paclitaxel sowie Docetaxel gegenüber den Therapien mit verschiedenen Zytostatika in Kombination auf eine bessere Anreicherungsrate der tumorverdächtigen Zellen hin. Der prozentuale Anteil der CETCs zur Gesamtzellzahl in der Positivfraktion nach der Separation war bei den Proben mit einer Taxanbehandlung signifikant höher (Paclitaxel: 0,46 %; Docetaxel: 0,29 %) als für die Kombinationstherapien (FEC: 0,06 %; EC: 0,10 %; Signifikanz Paclitaxel zur Kombination: $p \leq 0,035$). Bei nahezu ähnlichen Verhältnissen vor der Anreicherung (0,02 % bis 0,07 % CETCs zur Gesamtzellzahl in einem ml Blut; Tab. 17) zeigte sich für beide Taxantherapien eine insgesamt bessere Anreicherungsrate (Paclitaxel: 5,66; Docetaxel: 3,63) gegenüber einer FEC- (0,03) oder EC-Therapie (2,26). Ebenfalls bestätigte der Vergleich der Ausreißer, dass ein höherer maximaler Anreicherungsfaktor mit Paclitaxel oder Docetaxel erzielt werden konnte als mit einer Kombinationstherapie. Wobei auch hier die dargestellten Ausreißer auf das patientenspezifische Ausgangsmaterial zurück zu führen sind.

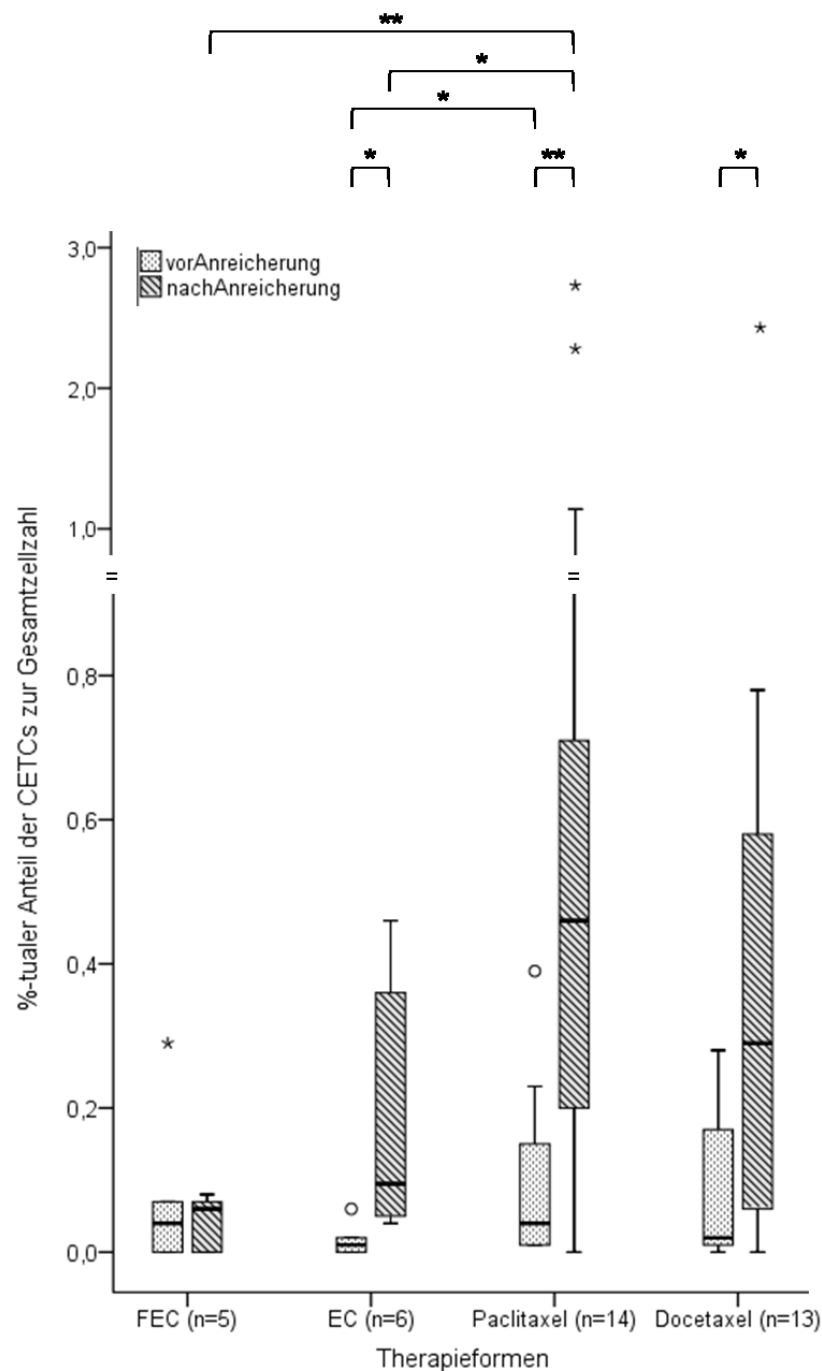


Abb. 23 Darstellung des prozentualen Anteils tumorverdächtiger Zellen vor sowie nach der MACS-Separation von Patienten während der Behandlung mit verschiedenen Formen der Chemotherapie.

Für die einzelnen Chemotherapieformen konnte in allen Fällen eine Steigerung des prozentualen Anteils der tumorverdächtigen Zellen (CETCs) zur Gesamtzellzahl durch die Separation erzielt werden. Zusätzlich konnte für fast alle Gruppen ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,015$) zwischen den Werten vor und nach der Anreicherung nachgewiesen werden. Die Taxanbehandlungen zeigten gegenüber den Kombinationstherapien (EC - Epi-doxorubicin/ Cyclophosphamid; FEC - Fluorouracil/ Epi-doxorubicin/ Cyclophosphamid) eine bessere Anreicherung der CETCs in der Positivfraktion. Dabei konnte speziell für die Therapie mit Paclitaxel ein signifikanter Unterschied vor als auch nach der Anreicherung zu den Kombinationen nachgewiesen werden ($p \leq 0,038$). Die im Diagramm abgebildeten signifikanten Abweichungen wurden mit dem parameterfreien statistischen Mann-Whitney U Test ermittelt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Bei der vergleichenden Betrachtung der Anzahl von CETCs in der angereicherten Fraktion nach der MACS-Separation blieben im Median mit einer Taxanbehandlung mehr tumorverdächtige Zellen erhalten als bei einer Kombinationstherapie (Tab. 17).

Tab. 17 Medianer Anreicherungsfaktor der tumorverdächtigen Zellen in der separierten Positivfraktion von Patienten während unterschiedlicher Chemotherapieformen.

	<i>Nicht-separierte Fraktion vor der Anreicherung</i>			<i>Angereicherte Fraktion nach MACS-Separation</i>			<i>̄x Anreicherungs- faktor [%]</i>
	Gesamtzell- zahl pro ml Blut ̄x	CETC- Zellzahl pro ml Blut ̄x	% ̄x	Gesamtzell- zahl in der PF ̄x	CETC- Zellzahl in der PF ̄x	% ̄x	
FEC (n=5)	3.689.000	2.600	0,04	140.800	100	0,06	0,03
EC (n=6)	4.612.000	700	0,01	117.891	300	0,10	2,26
Paclitaxel (n=14)	3.439.250	2.500	0,04	187.200	1.000	0,46	5,66
Docetaxel (n=13)	4.283.000	1.248	0,02	290.400	1.000	0,29	3,63

(FEC – Fluorouracil/Epidoxorubicin/Cyclophosphamid; EC – Epidoxorubicin/Cyclophosphamid;
PF – Positivfraktion; ̄x - medianer Wert)

Um den Unterschied der Anreicherung tumorverdächtiger Zellen im Laufe einer Chemotherapie genauer beurteilen zu können, wurde eine prospektive Gruppe von Mammakarzinompatienten (n = 7) auf die Interaktionsrate der CETCs mit den magnetischen Partikeln und die Vitalität der tumorverdächtigen Zellen untersucht. Hierzu wurden Blutproben unmittelbar vor dem Beginn einer Behandlung, während sowie nach der Therapie zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen. Die Blutproben wurden nach dem aufgezeigten Separationsregime (siehe Abb. 15) aufgearbeitet und anhand der gleichen Gesichtspunkte ausgewertet. Schon bei der Betrachtung der Gesamtzellzahl pro ml Blut fiel auf, dass durch die Chemotherapie im Median 10 % weniger Zellen in einem ml Vollblut vorhanden waren ($3,78 \times 10^6$ Zellen/ml) gegenüber vor der Behandlung ($4,22 \times 10^6$ Zellen/ml). Nach Abschluss der Therapie normalisiert sich der Wert der Gesamtzellzahl pro ml Vollblut wieder ($4,85 \times 10^6$ Zellen/ml). Bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation wurden vor Therapiebeginn im Schnitt 14 % der vorhandenen Zellen mittels der magnetischen Partikel beladen. Durch das Einsetzen der Chemotherapie verringerte sich der Anteil der Zellen, welche durch die CMD-umhüllten MNP magnetisch markiert wurden. Während in den Proben nach der Chemotherapie im Schnitt 10 % der Zellen mit den Partikeln interagierten, lag der mediane Wert des Zellanteils in der Positivfraktion während der Therapie nur bei 9 % (Abb. 24).

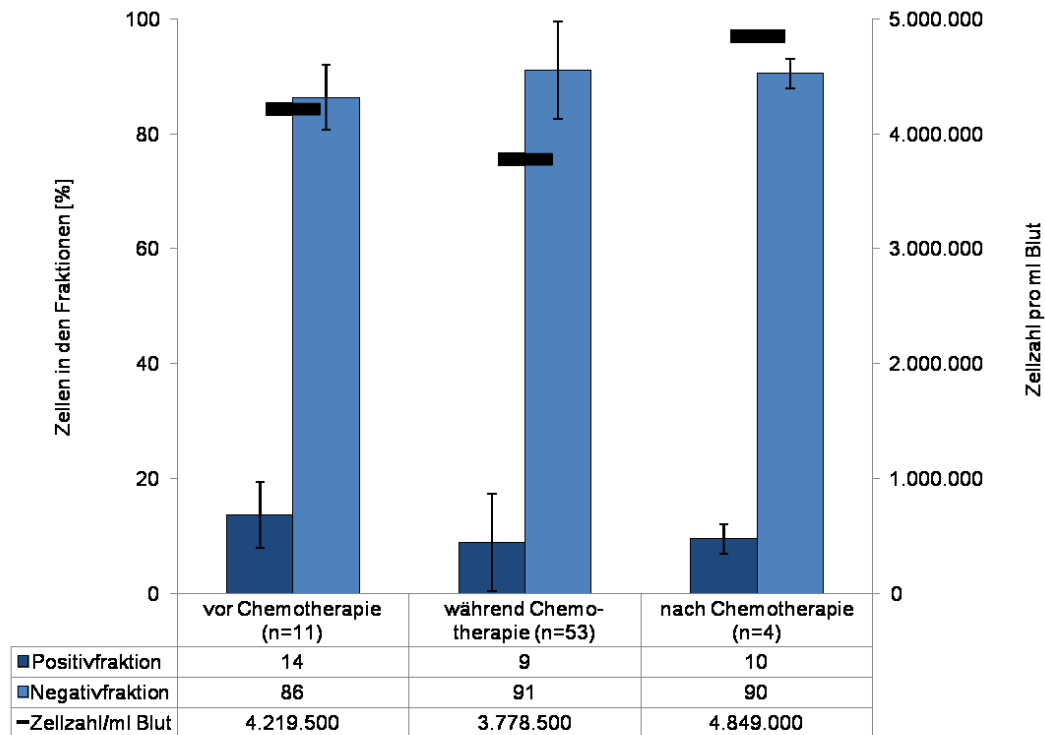


Abb. 24 Bestimmung der Zellzahl pro ml Vollblut sowie die prozentuale Verteilung der Zellen in den separierten Fraktionen nach der MACS-Separation von Patienten vor, während und nach Chemotherapie. Bei Betrachtung der Gesamtzellzahl pro ml Blut fällt auf, dass während einer Behandlung mit Zytostatika im Median 10 % weniger Zellen in einem ml Blut waren, als bei den Proben vor Therapiebeginn. Nach Abschluss der Zytostatikatherapie normalisiert sich der Wert der Gesamtzellzahl pro ml Blut auf ca. $4,8 \times 10^6$ Zellen. Bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation wurden 9 % bis 14 % der Zellen durch die Nanopartikel magnetisch markiert und befanden sich in der Positivfraktion. Mehr als 86 % der Zellen lagen magnetisch nicht beladen in der negativen Fraktion vor.

Bei der Darstellung der einzelnen Zelltypen in der positiven Fraktion nach der Anreicherung war die unterschiedlich gute magnetische Markierung der tumorverdächtigen Zellen deutlich festzustellen (Abb. 25). Vor Beginn der Chemotherapie konnten im Median 82 % der nach der Separation vorliegenden zirkulierenden epithelialen Zellen mittels der Partikel magnetisch beladen werden. Dagegen interagierten nur 12 % CETCs während einer Chemotherapie mit den CMD-umhüllten Nanopartikeln. Das bedeutet, dass 88 % der tumorverdächtigen Zellen nach der Separation in der Negativfraktion vorlagen und nicht durch die Nanopartikel magnetisch markiert werden konnten. Eine gute Wechselwirkung der CETCs mit den magnetischen Partikeln konnte nach Abschluss der Therapie erzielt werden. Mit 76 % der CETCs in der Positivfraktion, bezogen auf die Gesamtzahl der tumorverdächtigen Zellen nach der Separation, zeigten diese Zellen wieder eine vergleichbare Interaktion zu den CMD-umhüllten Partikeln wie vor Beginn der Therapie. Die Anzahl der Leukozyten in der Positivfraktion blieb unabhängig von der Therapie nahezu konstant (9 % bis 10 % bezogen auf die Gesamtleukozytenzahl nach Separation).

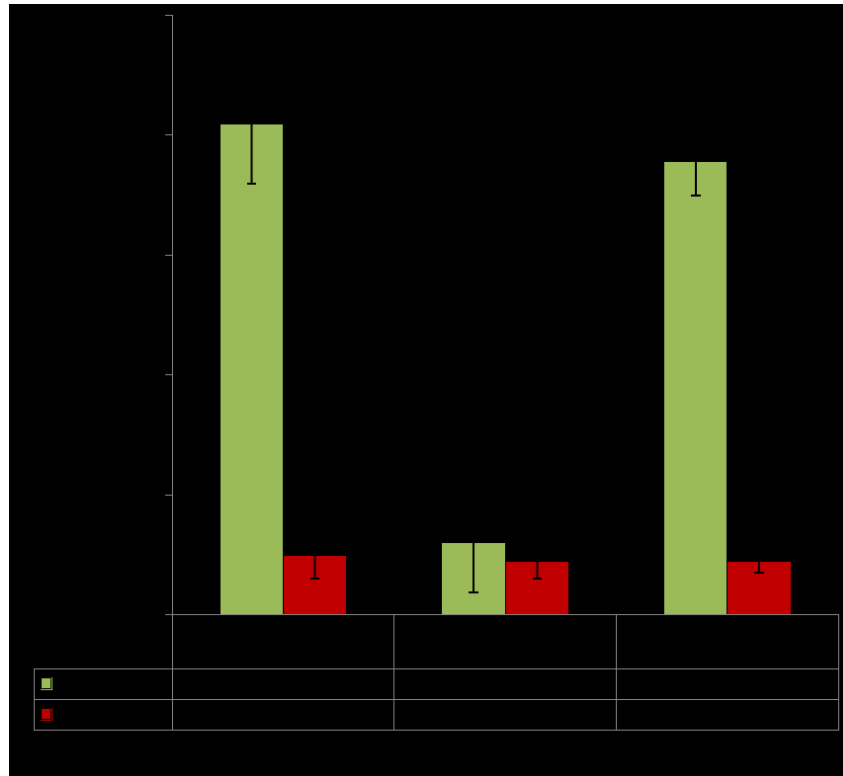


Abb. 25 Verteilung der Zelltypen in der Positivfraktion nach der MACS-Separation von Patienten vor, während und nach Chemotherapie.

Bezogen auf die Gesamtleukozytenzahl nach der Separation wurden therapieunabhängig maximal 10 % der hämatogenen Zellen magnetisch markiert und befanden sich in der Positivfraktion. Zusätzlich konnte für die Proben vor Beginn und nach Abschluss der Chemotherapie eine gute Wechselwirkung der tumorverdächtigen Zellen (CETCs) mit den Nanopartikeln erzielt werden (mind. 76 %). Lediglich die Proben, welche zum Zeitpunkt während einer Zytostatikatherapie gewonnen wurden, zeigten eine schlechte magnetische Beladung der CETCs durch die Partikel.

Die erhaltenen Ergebnisse ließen vermuten, dass der Anreicherungsfaktor während einer Chemotherapie niedriger ausfallen wird als vor einer Behandlung. Während vor der Chemotherapie im Median eine 2-fache Anreicherung durch die magnetischen Nanopartikel erzielt werden konnte, wurden während einer Chemotherapie kaum noch tumorverdächtige Zellen magnetisch markiert. Hierbei konnte für die CETCs kein Anreicherungseffekt nachgewiesen werden (medianer Anreicherungsfaktor: 0,19; $p = 0,006$; Abb. 26). Dieses signifikante Ergebnis ist allerdings nicht auf eine reduzierte Zahl tumorverdächtiger Zellen zurück zu führen (prozentualer Anteil CETCs vor der Anreicherung: 0,06 %). Vielmehr scheinen die Tumorzellen nicht mit den magnetischen Partikeln interagieren zu können und lagen daher in der Negativfraktion vor. Nach Abschluss der Chemotherapie konnte der Anteil der CETCs, bei ähnlicher Gesamtzellzahl in der Positivfraktion wie vor der Therapie, mehr als verdoppelt werden (medianer Anreicherungsfaktor: 2,84; Tab. 18). Die Untersuchungen zum prozentualen Anteil der tumorverdächtigen Zellen zur Gesamtzellzahl in der angereicherten Fraktion ergaben sowohl für die Proben vor, wie auch für die Proben nach

Ender der Chemotherapie einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,014$; Abb. 26) zu den Werten, welche während der Behandlung ermittelt werden konnten.

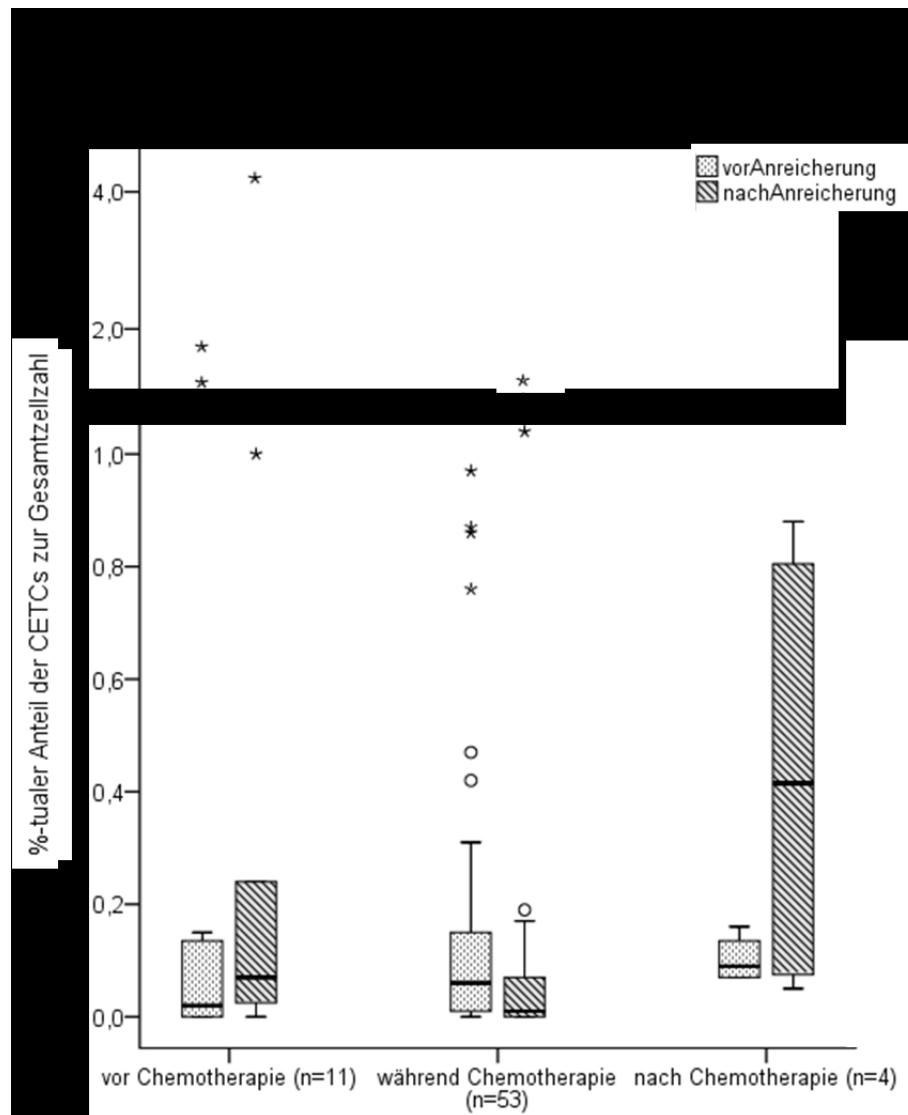


Abb. 26 Darstellung des prozentualen Anteils tumorverdächtiger Zellen vor sowie nach der MACS-Separation von Patienten im Verlaufe einer Chemotherapie.

Für die Proben der Patienten vor Beginn sowie nach Abschluss einer Chemotherapie konnte durch die Separation eine Steigerung des prozentualen Anteils der tumorverdächtigen Zellen (CETCs) zur Gesamtzellzahl erzielt werden (%-tualer Anteil CETCs vor bzw. nach der Anreicherung: 0,02 zu 0,07 für die Proben vor Chemotherapie bzw. 0,09 zu 0,42 für die Proben nach Chemotherapie). Dagegen zeigten die CETCs während einer Zytostatikabehandlung keinen Anreicherungseffekt (%-tualer Anteil CETCs vor bzw. nach der Anreicherung: 0,06 zu 0,01; $p = 0,006$). Zusätzlich konnte für die Proben vor, wie auch für die Proben nach Ender der Chemotherapie einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,014$) zu den Werten, welche während der Behandlung ermittelt wurden, nachgewiesen werden. Die im Diagramm gezeigten Signifikanzen wurden mit dem parameterfreien statistischen Mann-Whitney U Test ermittelt (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

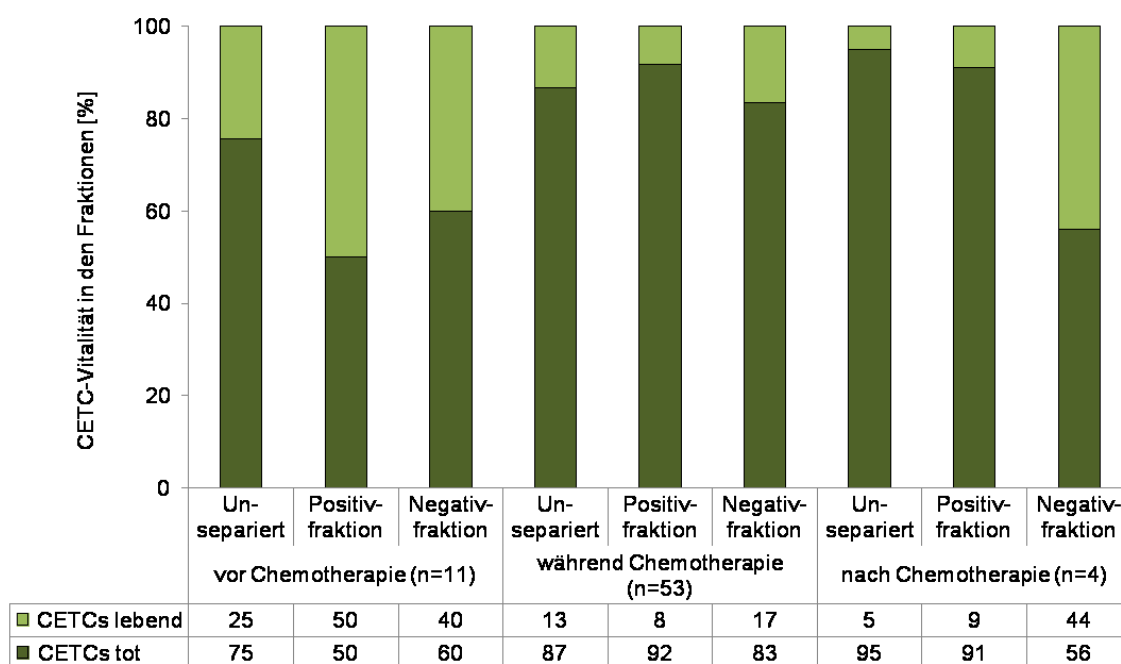
Während die Gesamtzellzahl in 1 ml Blut unter der Chemotherapie abfiel, nahm die Zahl der tumorverdächtigen Zellen im Verlauf der Behandlung im Median zu (vor Chemotherapie: 2.875 CETCs/ml Blut; während Chemotherapie: 2.000 CETCs/ml Blut; nach Chemotherapie: 4.750 CETCs/ml Blut; Tab. 18).

Tab. 18 Medianer Anreicherungsfaktor der tumorverdächtigen Zellen in der separierten Positivfraktion von Patienten vor, während und nach Chemotherapie.

	<i>Nicht-separierte Fraktion vor der Anreicherung</i>			<i>Angereicherte Fraktion nach MACS-Separation</i>			<i>̄x Anreicherungs- faktor [%]</i>
	Gesamtzell- zahl pro ml Blut	CETC- Zellzahl pro ml Blut	%	Gesamtzell- zahl in der PF	CETC- Zellzahl in der PF	%	
	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	
vor Therapie (n=11)	4.219.500	2.875	0,02	296.800	335	0,07	2,00
während Therapie (n=53)	3.778.500	2.000	0,06	215.200	26	0,01	0,19
nach Therapie (n=4)	4.849.000	4.750	0,09	299.600	1.057	0,42	2,84

(PF – Positivfraktion; \bar{x} – medianer Wert)

Zusätzlich zur Anreicherung wurde die Vitalität der Zellen während der Chemotherapie beobachtet (Abb. 27). Hierfür wurden die Zellen zusätzlich zum Anti-EpCAM-Antikörper mit dem Apoptosemarker Propidiumiodid markiert.

**Abb. 27** Vitalität der tumorverdächtigen Zellen in den einzelnen Fraktionen vergleichend von Patienten vor, während und nach Chemotherapie.

Bereits in der nicht-separierten Fraktion der Patienten vor Chemotherapie lagen 75 % der tumorverdächtigen epithelialen Zellen (CETCs) tot vor. Nur 25 % der CETCs konnten vor einer Behandlung mit verschiedenen Zytostatika als vital bewertet werden. Dieser Wert minimiert sich während der Chemotherapie auf 13 % bzw. nach Abschluss der Therapie auf 5 %. In der positiven Fraktion konnten bei den Patientenproben vor Beginn der Chemotherapie 50 % vitale Zellen magnetisch markiert werden. Dagegen lagen während und nach einer Behandlung mehr als 90 % der Zellen in der Positivfraktion apoptotisch vor. In der Negativfraktion konnten vor und nach Chemotherapie mehr als 40 % der CETCs als vital bewertet werden. Durch die Behandlung mit Zytostatika minimierte sich dieser Wert auf 17 %.

Bereits in der nicht-separierten Fraktion der Patienten vor Chemotherapie lagen 75 % der tumorverdächtigen epithelialen Zellen tot vor. Nur 25 % der CETCs konnten vor einer Behandlung mit verschiedenen Zytostatika als vital bewertet werden. Dieser Wert minimierte sich wie erwartet während der Chemotherapie auf im Median 13 % bzw. nach Abschluss der Therapie auf 5 %. Der regressive Effekt war auch für die Fraktionen nach der magnetischen Separation ersichtlich. Während bei den Patientenproben vor Beginn der Chemotherapie 50 % vitale Zellen magnetisch markiert werden konnten, so lagen während und nach einer Behandlung mehr als 90 % der Zellen in der Positivfraktion apoptotisch vor. Auch in der negativen Fraktion minimierte sich der Anteil von 40 % vitaler Zellen durch die Chemotherapie auf 17 %. Nach Abschluss der Chemotherapie konnten 44 % der CETCs in der Negativfraktion als vital beurteilt werden.

Die signifikant schlechtere magnetische Markierung der tumorverdächtigen Zellen durch die CMD-umhüllten Nanopartikel während einer Chemotherapie konnte bei einer Vielzahl von Mammakarzinompatienten im Verlauf der Behandlung beobachtet werden. Vergleichend zu dem Patientenbeispiel in Abb. 28 zeigte die Durchführung einer Zytostatikabehandlung in fast allen Fällen eine deutliche Reduktion der CETC-Zahl pro ml Blut sowie eine Abnahme in der Wechselwirkung der vorhandenen tumorverdächtigen Zellen zu den magnetischen Partikeln. Die dargestellte Karzinompatientin erhielt eine adjuvante Chemotherapie in Form einer Kombinationstherapie (vier Zyklen Epirubicin/ Cyclophosphamid) mit anschließender Taxanbehandlung (zwölf Zyklen Paclitaxel) in Verbindung mit Trastuzumab. Durch den Beginn der Behandlung sank die Zahl der tumorverdächtigen epithelialen Zellen zunächst drastisch ab (von 73.600 CETCs/ml Blut auf 750 CETCs/ml Blut), stieg allerdings durch den Zytostatikawechsel auf Paclitaxel zwischenzeitlich wieder auf bis zu 8.250 CETCs/ml Blut an. Eine erhöhte CETC-Zahl pro ml Blut unter einer Taxantherapie konnte bereits bei der Betrachtung der einzelnen Formen der Chemotherapie beobachtet werden (700 CETCs/ml Blut während EC-Therapie, 2.500 CETCs/ml Blut während Paclitaxelbehandlung; Tab. 17). Nach Abschluss der Therapie konnte der Anteil der epithelialen Zellen bei 3.500 CETCs/ml Blut nahezu konstant gehalten werden. Mit dem Behandlungsbeginn nahm gleichzeitig auch die magnetische Markierbarkeit der vorhandenen CETCs ab. Während vor der Chemotherapie 87 % der tumorverdächtigen Zellen, bezogen auf die CETC-Gesamtzahl nach der Separation, magnetisch beladen werden konnten, sank der Wert unter der EC-Kombinationstherapie auf 4 % ab. Wie auch bei der Untersuchung der einzelnen Chemotheapieformen (Abb. 22) war der prozentuale Anteil der tumorverdächtigen Zellen in der Positivfraktion unter der

Taxantherapie höher, als während der Kombinationstherapie. Am Ende der Behandlung mit Paclitaxel interagierten sogar 59 % der nach der Separation detektieren CETCs mit den CMD-umhüllten Partikeln. Unter der Nachbehandlung mit Trastuzumab stieg der Anteil der magnetisch markierbaren CETCs in der positiven Fraktion weiter auf 80 % an (Abb. 28).

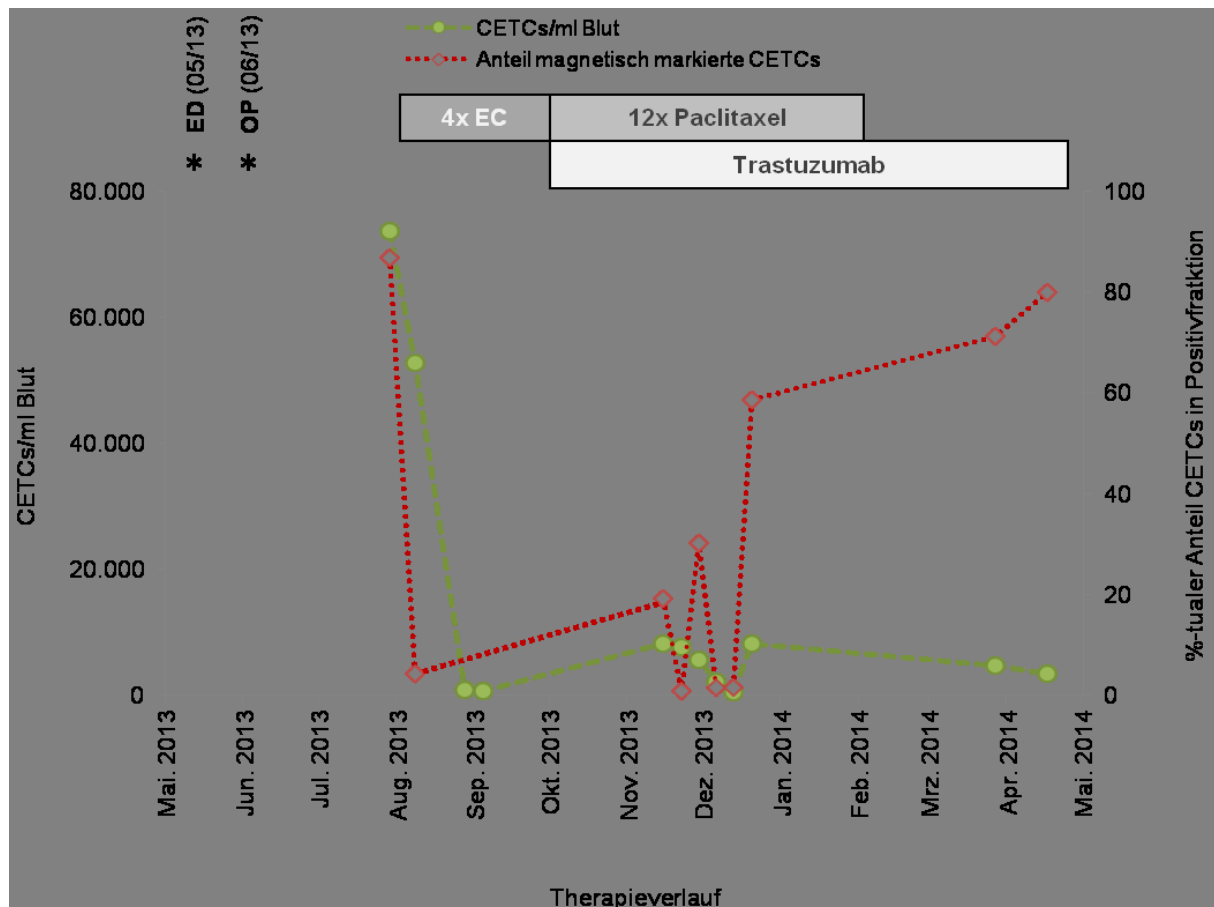


Abb. 28 Beobachtung von tumorverdächtigen Zellen pro ml Blut und deren Wechselwirkung mit magnetischen Nanopartikeln am Beispiel einer Mammakarzinompatientin im Verlauf einer Chemotherapie. Die Durchführung der Chemotherapie zeigt eine deutliche Reduktion der Zahl tumorverdächtiger Zellen (CETCs) pro ml Blut während und auch nach der Behandlung. Gleichzeitig nimmt mit Beginn der Zytostatikabehandlung auch die magnetische Markierbarkeit der vorhandenen CETCs ab. Erst am Ende bzw. nach Abschluss der Therapie interagieren die existierenden Zellen wieder besser mit den magnetischen Nanopartikeln (EC – Epirubicin/ Cyclophosphamid, ED – Erstdiagnose, OP – Operation).

Um eine mögliche Korrelation zwischen der Nanopartikelinteraktion von CETCs und dem klinischen Hintergrund der Patienten aufzudecken, wurde für alle im Untersuchungszeitraum neu-erkrankten sowie noch unbehandelten Mammakarzinompatienten ($n = 17$) der Rezeptorstatus des Primärtumors ermittelt. Dabei konnte kein Bezug der MNP-Beladung zum Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, als auch zum HER2 Status festgestellt werden.

Um den Einfluss einer Zytostatikabehandlung auf das Interaktionsverhalten der behandelten Zellen zu den CMD-Partikeln genauer untersuchen zu können, wurden mit Cyclophosphamid Kurzzeitinkubationsversuche (bis zu 4 h mit EDTA-Patientenvollblutproben) sowie Langzeitversuche (4 Tage mit humaner Tumorzellkultur) durchgeführt.

Für die Kurzzeitversuche an Vollblutproben wurden mehrere EDTA-Vollblutproben von Mammakarzinompatienten in Nachsorge gepoolt und jeweils 1 ml Vollblut mit verschiedenen Konzentrationen Cyclophosphamid für unterschiedliche Zeiträume (0,5 h, 2 h und 4 h) bei 37 °C behandelt. Für die zu testenden Verdünnungen wurde der im Patient, zum Zeitpunkt der Chemotherapie, vorliegende Konzentrationsspiegel des Zytostatikums ermittelt (Konzentration im Blutäquivalent des Patienten: 0,02 mg/ml). Zusätzlich zu der Konzentration wurde eine 10-fache Verdünnung (0,002 mg/ml), ebenso wie eine 10-fache höhere Konzentration (0,2 mg/ml) getestet. Nach der Zytostatikabehandlung erfolgten die Blutlyse der behandelten Probe und die magnetische Anreicherung der tumorverdächtigen Zellen mit MNP@CMD mittels der MACS-Methode.

Bei Betrachtung der Zelltypenverteilung in der separierten Positivfraktion fiel auf, dass die Inkubation der unbehandelten Zellen bei 37 °C eine zeitabhängige Zunahme in der Aufnahmerate der magnetischen Partikel sowohl durch die Leukozyten als auch für die tumorverdächtigen Zellen gezeigt werden konnte. Während nach einer halben Stunde bei 37 °C 13 % der Leukozyten und 83 % der CETCs magnetisch markiert wurden, konnten nach 4 h bereits 21 % der Leukozyten und 88 % der zirkulierenden epithelialen Zellen mit Partikeln beladen werden. Für die blutäquivalente Konzentration von Cyclophosphamid (0,02 mg/ml) und die 10-fach niedrigere Verdünnung (0,002 mg/ml) konnte eine deutliche Abnahme der Interaktionsrate der Partikel durch die CETCs nachgewiesen werden. Die magnetische Markierung der CETCs sinkt von 87% auf 74 % beziehungsweise für die geringere Konzentration von 94 % auf 80 %. Die Leukozyten waren von einer bis zu 2-stündigen Behandlung relativ unberührt, zeigten aber nach einer 4 h Inkubation mit dem Zytostatikum eine Zunahme in der Interaktionsrate der Nanopartikel. Bei der Vollblutbehandlung mit 0,2 mg/ml Cyclophosphamid war nach 2 h eine Abnahme der CETC-Markierung von 88 % auf 74 % zu verzeichnen, welche nach 4 h wieder in eine starke Zunahme abwich (88 %). Hierfür zeigten die Leukozyten mit Erhöhung der Inkubationszeit einen leichten Anstieg in ihrer magnetischen Markierung (11 % zu 15 %). Generell konnte für alle getesteten Zytostatikakonzentrationen nach 4 h eine erhöhte Aufnahmerate der magnetischen Partikel

durch die Leukozyten gezeigt werden. Ähnliche Versuche an einer lysierten Leukozytenfraktion von gepoolten Nachsorgepatienten zeigten durch die Behandlung mit Zytostatika eine starke Bildung von Zellagglomeraten, wodurch eine magnetische Anreicherung der tumorverdächtigen Zellen nicht möglich war (Abb. 29).

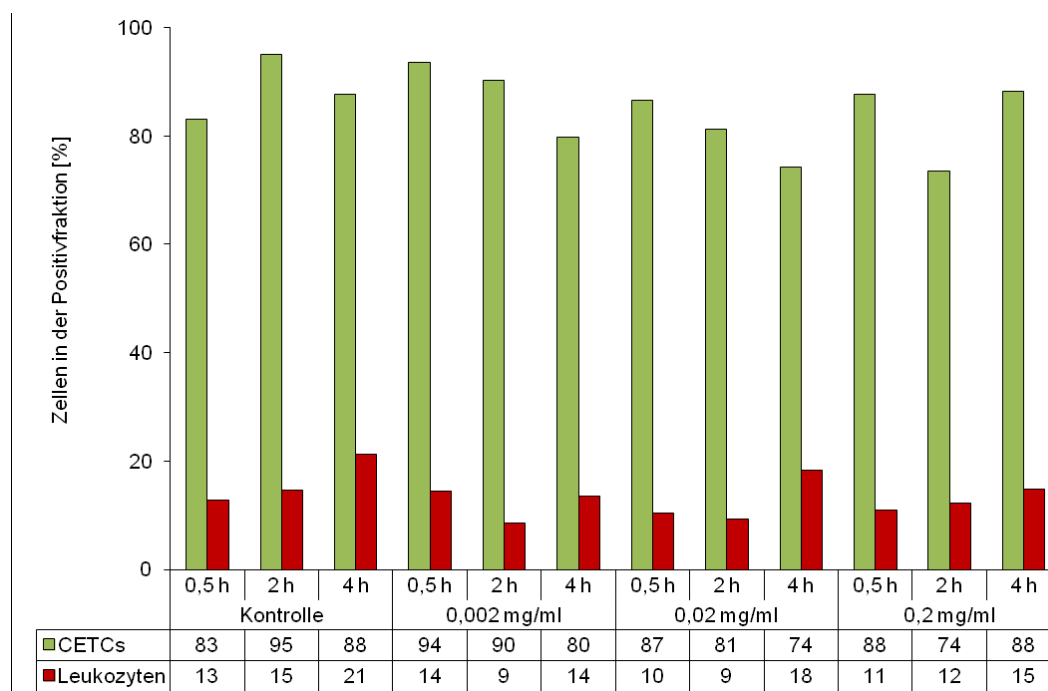


Abb. 29 Verteilung der Zelltypen in der Positivfraktion nach der MACS-Separation einer Patientenprobe nach der Inkubation mit Cyclophosphamid (n = 1, am Patientenpool).

Bezogen auf die Gesamtzellzahl der tumorverdächtigen Zellen (CETCs) nach der Separation konnte für die Cyclophosphamidkonzentrationen 0,002 mg/ml und 0,02 mg/ml eine zeit- sowie konzentrationsabhängige Abnahme in der magnetischen Markierung dieser Zellen erfasst werden. Die Leukozyten waren von einer bis zu 2-stündigen Zytostatikabehandlung relativ unberührt, zeigten aber nach einer 4 h Inkubation eine Zunahme in der Aufnahmerate der Nanopartikel. Für die Konzentration 0,2 mg/ml konnte nach 4 h sowohl für die Leukozyten, als auch für die CETCs eine Steigerung der magnetischen Beladung beobachtet werden.

Zusätzlich wurde an der humanen Tumorzelllinie ein Langzeitversuch durchgeführt, um den Effekt von Cyclophosphamid auf die Interaktionsrate der Zellen auf die CMD-umhüllten Nanopartikel zu untersuchen. Hierfür wurde die humane Myelomzelllinie RPMI-8226 verwendet, die gegenüber einer adhärenenten Mammakarzinomzelllinie wie MCF-7 ähnliche Charakteristika zu Leukozyten aufweist. Auf die Verwendung von Patientenblutproben wurde hierbei verzichtet, da das Überleben der primären Zellen in einer Kultur über mehrere Tage nicht gewährleistet werden konnte.

Eine definierte Zellzahl wurde in eine 25 cm²-Zellkulturfalschen überführt und für vier Tage mit der blutäquivalenten Konzentration von Cyclophosphamid (0,02 mg/ml) in Zellkulturmedium (RPMI + 10 % FCS) kultiviert. Nach der 4-tägigen Inkubation mit dem Zytostatikum wurden die Zellen unter einem Kontrastmikroskop begutachtet und anschließend für die Magnet-basierte Separationsmethode gewonnen. Durch die 4-tägige Kultivierung der Zellen mit dem Zytostatikum war eine Hemmung der Zellproliferation eingetreten. Bei der unbehandelten Kultur konnten $4,45 \times 10^6$ Zellen pro ml ermittelt werden. Hingegen zeigte die behandelte Probe eine knapp 10 % geringere Zellzahl pro ml ($4,09 \times 10^6$ Zellen/ml, Abb. 30 A) auf.

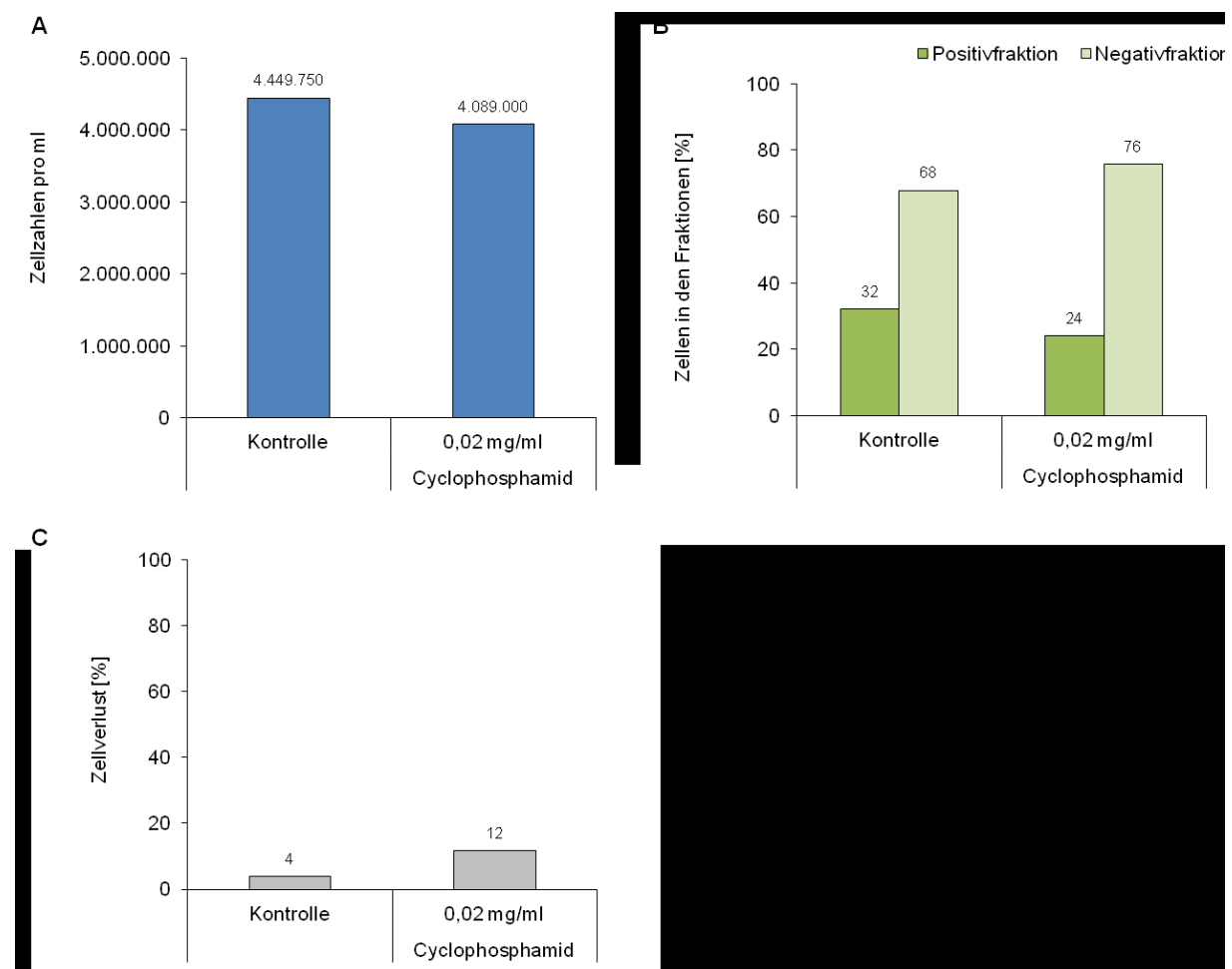


Abb. 30 Untersuchung des Einflusses von Cyclophosphamid auf das Interaktionsverhalten von humanen RPMI-8226 Zellen zu magnetischen Nanopartikeln nach 4-tägiger Inkubation (n = 1).

(A) Zellzahlbestimmung: nach der 4-tägigen Behandlung der humanen Zellkultur mit dem Zytostatikum konnte eine Reduktion der Zellzahl pro ml festgestellt werden. (B) Zellzahlbestimmung in den separierten Fraktionen (bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation): die mit Cyclophosphamid kultivierte Fraktion zeigte, gegenüber der unbehandelten Probe, eine schwächere magnetische Markierung der humanen Tumorzellen (24 % gegenüber 32 % RPMI-8226 in der Positivfraktion). (C) Bestimmung des auftretenden Zellverlustes (bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation): durch die Zytostatikabehandlung ergab sich ein Anstieg in der Verlustrate der Zellen (von 4 % auf 12 %) durch die MACS-Separation.

Wie erwartet, zeigte die mit Cyclophosphamid kultivierte Fraktion eine schwächere magnetische Markierung der Zellen (24 % der Zellen in der Positivfraktion) gegenüber der unbehandelten Probe (32 % der Zellen in der Positivfraktion, Abb. 30 B). Der negative Einfluss der Zytostatikabehandlung verdeutlichte sich ebenfalls an den Zahlen bezüglich des Zellverlustes, welcher durch die MACS-Separation resultiert. Während für die Kontrollprobe ein minimaler Verlust von 4 % festgestellt werden konnte, zeigte die behandelte Fraktion mit 12% einen deutlichen Anstieg der Verlustrate (Abb. 30 C). Auch bei der mikroskopischen Betrachtung der Zellen konnte ein Unterschied durch die Behandlung festgestellt werden. Die charakteristische Suspensionszelllinie RPMI-8226 mit etwa 30 bis 50 % adhärent wachsenden Zellen zeigte nach der Inkubation mit Zytostatika eine deutliche Reduktion des als Monolayer vorliegenden Zellanteils.

Zusammengefasst konnte erstmalig gezeigt werden, dass ein Effekt der jeweiligen Therapie des Patienten auf die Interaktion von Zellen mit CMD-umhüllten Partikeln nachweisbar war. So konnte eine gute Anreicherung der tumorverdächtigen Zellen für Patienten vor der operativen Entfernung des Tumors oder für Patienten in Nachsorge beobachtet werden, während sich eine Chemotherapie oder Bestrahlung negativ auf die Anreicherung auswirkte. Eine besonders gute magnetische Markierung der Zellen konnte durch die Behandlung mit Bisphosphonaten wie Zoledronsäure erzielt werden. Darüber hinaus konnte an einer Gruppe von Patienten beobachtet werden, dass die tumorverdächtigen Zellen während einer Chemotherapie eine verringerte Interaktionsrate aufwiesen als vor Beginn oder nach Abschluss der Behandlung. Durch Inkubationsversuche mit Cyclophosphamid wurde der negative Einfluss des Zytostatikums auf das Wechselwirkungsverhalten der umhüllten Partikel durch die behandelten Zellen experimentell nachgewiesen.

4.2 Genotypisierung tumorverdächtiger Zellen

Heute ist bekannt, dass es sich bei einem Tumorgewebe nicht um eine einheitliche Zellmasse handelt, sondern dass der Tumor aus einer Vielzahl von funktionell unterschiedlichen Tumorzellen besteht. Die technologische Weiterentwicklung der Sanger-Sequenzierung ermöglicht die umfassende Charakterisierung genetischer Veränderungen einzelner Krebspatienten und bietet zudem die Möglichkeit Tumoren differenzierter zu betrachten. Beispielsweise können einzelne Zellpopulationen anhand genetischer Analysen auf ihre molekularen Eigenschaften untersucht werden. Die Ergebnisse zur Quantifizierung der tumorverdächtigen Zellen (CETCs, *circulating epithelial tumor cells*; Kapitel 4.1.2), zu

verschiedenen Therapiezeitpunkten, zeigte für die Gruppen der Patienten nach einer Bestrahlung sowie nach einer Behandlung mit Taxanen eine Zunahme der CETC-Anzahl pro ml Vollblut. Der Anstieg der tumorverdächtigen Zellen nach einer Taxantherapie wurde bereits zuvor in der Literatur beschrieben (Camara et al., 2007). Darüber hinaus konnte für Patienten vor einer operativen Entfernung des Tumors, wie auch für Patienten in Nachsorge eine sehr gute magnetische Markierung der CETCs durch Dextran-umhüllte Nanopartikel erzielt werden.

Eine Genotypisierung der markierten Zellen kann Aufschluss über den Mutationsstatus der Zelle und somit auch über das mögliche Aggressivitätspotenzial geben. Zusätzlich würde eine genetische Untersuchung der CETCs nach einer Bestrahlungs- sowie Taxantherapie eine Aufklärung über die Zunahme der Zellzahl tumorverdächtiger Zellen zulassen. Im Zusammenhang mit einem BMBF-geförderten Verbundprojekt („MiNa-CTC“ – Erarbeitung eines mobilen mikrosystemtechnischen Gesamtsystems für Anreicherung, Nachweis und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen) werden magnetisch angereicherte Zellpopulationen von Mamma- als auch kolorektalen Karzinompatienten genetisch charakterisiert. Hierbei erlauben die molekularen Analysen ein spezifisches Therapiemonitoring sowie eine optimale Anpassung der Therapie an den jeweiligen Patienten. Da oft nur kleine Zellsubpopulationen in einem heterogenen Tumorgewebe beispielsweise eine Therapieresistenz zeigen, ist es erforderlich charakteristische Therapietargets in diesen Zellen zu identifizieren. Für das kolorektale Karzinom werden onkogene *KRAS*-Mutationen (*kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) beschrieben, welche zu einer intrinsischen Aktivierung der EGFR-abhängigen Signaltransduktionskaskade führen (Finkelstein et al., 1993; Stintzing et al., 2009). Eine zielgerichtete Therapie mittels monoklonaler Antikörper gegen den EGF-Rezeptor (EGFR, *epithelial grow factor receptor*) ist in diesem Fall nicht möglich. Die Erhebung des *RAS*-Mutationsstatus (*KRAS* und *NRAS*) gehört heute zur Routinediagnostik für das kolorektale Karzinom. Diese Gruppe der Karzinompatienten bietet sich daher an, um die magnetisch angereicherte CETCs auf den bereits bekannten *KRAS*-Status zu überprüfen und so die angereicherte Zellpopulation näher charakterisieren zu können. Die Hoffnung besteht, dass über eine Blutprobe von Krebspatienten der Nachweis und das Monitoring solch wichtiger molekularer Marker gelingt.

4.2.1 Etablierung der Mutationsanalysen

Zunächst wurde die Untersuchung irreversibler Änderungen des Erbgutes auf Einzelzellniveau anhand verschiedener humaner Zellkulturen etabliert. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen häufigen Mutationen beim Mammakarzinom und kolorektalen Tumoren wurden die Gene *KRAS* (*kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) und *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*) analysiert. Hierfür wurden einzelne humane Tumorzellen aus Kulturen unterschiedlicher Zelllinien (Tab. 19) mit Hilfe des Zellmanipulators AVISO-CellCelector gewonnen und auf die beschriebenen Punktmutationen hin untersucht. Zusätzlich zu den Einzelzellen wurde darüber hinaus immer die DNA aus dem zugehörigem Zellverband für die genetische Analyse eingesetzt.

Tab. 19 Untersuchte mutierte Zelllinien und ihre Eigenschaften.

Zelllinie	Mutation			Referenz
	Protein-Variation	DNA-Variation		
<u>BRAF</u> (Exon 15)				
HT29	V600E	1799T>A	he	Thomas et al., 2007
<u>KRAS</u> (Exon 2)				
A549	G12S	34G>A	ho	Simi et al., 2008
RPMI-8226	G12A	35G>C	ho	Thomas et al., 2007
MDA-MB-231	G13D	38G>A	he	Thomas et al., 2007
HCT-116	G13D	38G>A	he	Simi et al., 2008
<u>PIK3CA</u> (Exon 20)				
T47D	H1047R	3140A>G	he	Thomas et al., 2007
HCT-116	H1047R	3140A>G	he	Simi et al., 2008

(he – heterozygot; ho – homozygot)

Nach der Isolation der Einzelzelle aus dem Zellverband („*multi cell*“, mc) und der anschließenden *Whole Genome Amplification* der Zelle wurde zunächst eine Kontroll-PCR mit dem House-keeping Gen *RPL13A* durchgeführt. Dadurch konnte die Qualität der DNA kontrolliert und die Erfolgsrate des Pickvorganges ermittelt werden. Für jede getestete Zelllinie konnte erfolgreich ein *RPL13A* PCR-Produkt amplifiziert werden und somit eine zellkulturspezifische Pickerfolgsrate errechnet werden (Tab. 20). Für die Kontrolle des Wildtypes (wt) jeder untersuchten Genregion wurden einzelne Leukozyten aus dem Vollblut eines Probanden isoliert und analysiert.

Tab. 20 Zahl der isolierten Einzelzellen und die ermittelte Pickerfolgsrate.

<i>Zelllinie bzw. Leukozyten</i>	<i>Anzahl der isolierten Einzelzellen</i>	<i>Anzahl der erfolgreich isolierten Einzelzellen</i>	<i>Pickerfolgsrate [%]</i>
A549	59	28	47
HCT-116	6	6	100
HT29	35	23	66
MDA-MB-231	59	33	56
Leukozyten	5	5	100
RPMI-8226	24	19	79
T47D	34	25	74

Wenn für die isolierten Einzelzellen ein RPL13A PCR-Produkt amplifiziert werden konnte, wurde anschließend die isolierte DNA der Zelle für den beschriebenen interessierenden Genabschnitt amplifiziert und sequenziert. Für die Amplifikation der Einzelzell-DNA waren unterschiedliche Amplifikationsprotokolle für die untersuchten Gene nötig. Teilweise musste ein zusätzlicher PCR-Schritt eingebaut werden (nested PCR), um eine erfolgreiche Amplifikation des Genabschnittes zu gewährleisten (Abb. 31 am Beispiel des *BRAF*-Gens).

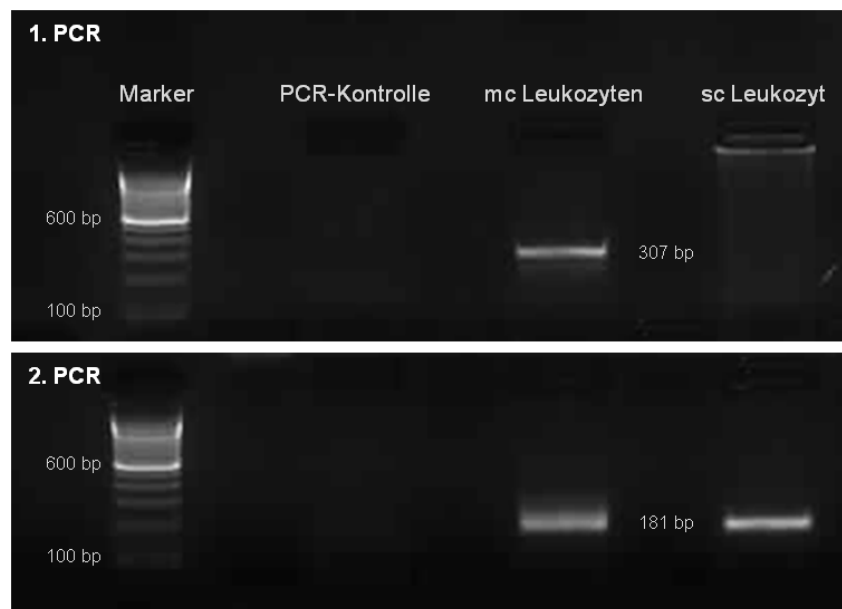


Abb. 31 Darstellung der nested PCR-Produkte des *BRAF*-Gens auf einem 3 %-igem Agarosegel. Für die erfolgreiche Amplifikation des *BRAF*-Genabschnittes der isolierten Einzelzell-DNA (sc, *single cell*) aus Leukozyten war eine nested PCR nötig. Hierfür wurde ein Teil des 307 bp große Produktes aus der ersten PCR als Matrize für einen weiteren Amplifikationsschritt eingesetzt. Das gebildete 181 bp große Amplikon konnte für anschließende Mutationsanalysen mittels Sequenzierung eingesetzt werden. Dagegen ist für die Gesamtzellanalyse (mc, *multi cell*) der Leukozyten die erste PCR ausreichend (bp – Basenpaare).

Anschließend wurden die Amplikons mittels Sanger-Sequenzierung näher charakterisiert. Durch die Auswertung des erhaltenen Chromatogramms konnte eine eindeutige Aussage über das untersuchte genetische Merkmal der Zelle getroffen werden und zwischen homozygoter (ho) sowie heterozygoter (he) Mutation unterschieden werden.

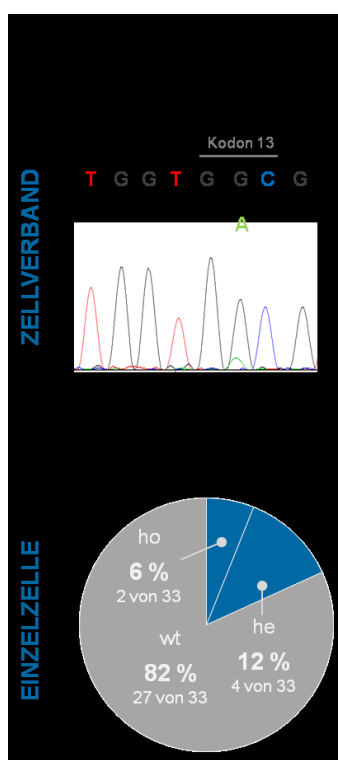
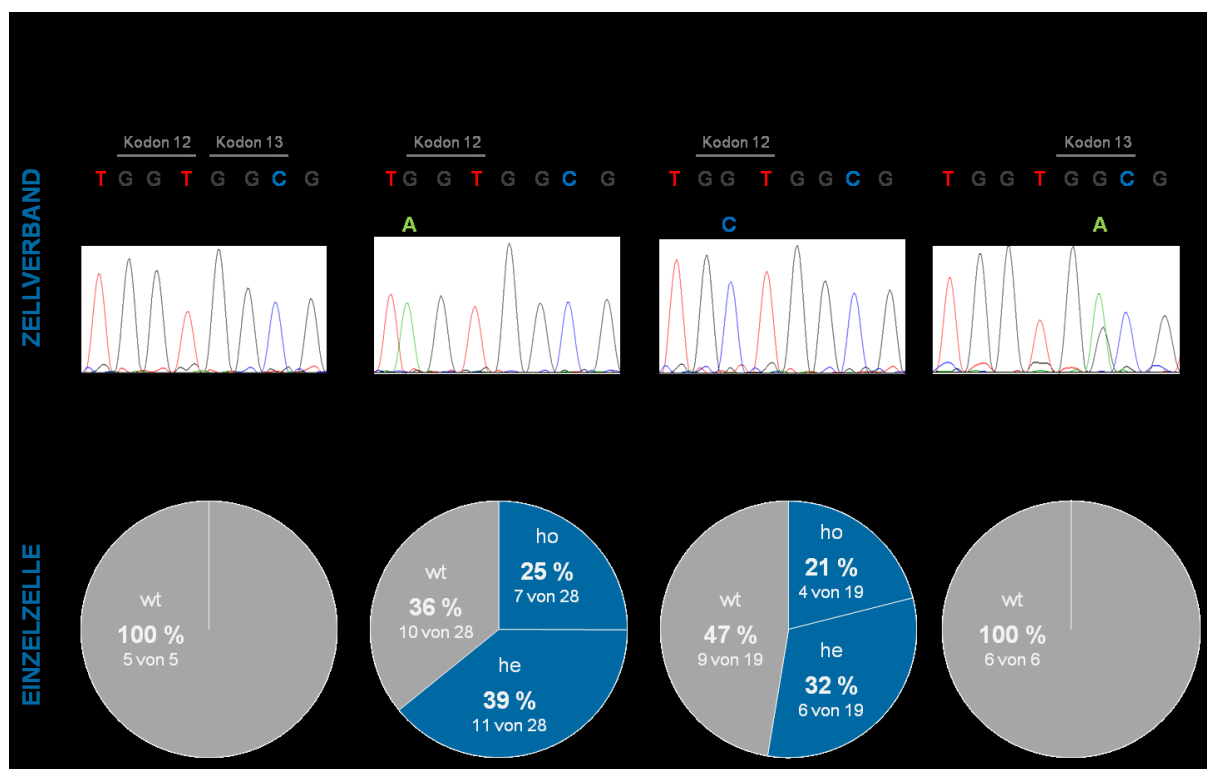


Abb. 32 Darstellung der ermittelten Mutationsraten des untersuchten *KRAS*-Gens von Einzelzellen im Vergleich zum Zellverband.

Die genetischen Analysen der Gesamtzell-DNA zeigten in allen untersuchten humanen Tumorzelllinien die in der Literatur beschriebene *KRAS*-Mutation im Kodon 12 bzw. 13. Zusätzlich konnte in fast allen Zelllinien die erwartete Genveränderung ebenfalls in den Einzelzellen nachgewiesen werden. Wobei sowohl heterozygote (he) als auch homozygote (ho) Ereignisse dokumentiert werden konnten. Lediglich für die kolorektale Zelllinie HCT-116 konnte keine mutierte Einzelzelle isoliert werden. Die Leukozyten zeigten sowohl für die Gesamtzellanalyse als auch für die Einzelzelluntersuchungen den erwarteten Wildtyp-Status.

Für die untersuchten Genabschnitte im Kodon 12 und 13 des *KRAS*-Gens konnte für die DNA aus dem Zellverband die in der Literatur beschriebene Mutation nachgewiesen werden (Abb. 32). Die Leukozyten zeigten sowohl für die isolierte DNA aus den Einzelzellen als auch für die genomische DNA aus dem Zellverband keine genetisch veränderten Merkmale. Die im Kodon 12 homozygot mutierte Lungenkarzinomzelllinie A549 (G12S) zeigte für die isolierten Einzelzellen in 10 von 28 Fällen (36 %) keine Mutation an der erwarteten Position. Mit insgesamt 64 % lag der größere Teil der Zellen mutiert vor. Dabei kam die beschriebene homozygote *KRAS*-Mutation mit 25 % (7 von 28 Fällen) seltener vor als eine heterozygote Genveränderung (39 %, 11 von 28 Fällen). Dieser Effekt konnte ebenfalls bei der humanen Myelomzelllinie RPMI-8226 festgestellt werden. Auch hier war die erwartete homozygote Veränderung im Kodon 12 (G12A) mit 21 % (4 von 19 Fällen) seltener vertreten als die heterozygote Mutation des *KRAS*-Gens (32 %, 6 von 19 Fällen). Knapp die Hälfte der isolierten Einzelzellen (47 %, 9 von 19 Fällen) zeigte ein Wildtyp-Signal an der erwarteten Position. Im Kodon 13 war der Nachweis einer genetischen *KRAS*-Veränderung in den Einzelzellen gegenüber dem Zellverband ein seltenes Ereignis. Während für die kolorektale Karzinomzelllinie HCT-116 keine mutierte Einzelzelle gewonnen werden konnte, zeigten die Einzelzellen der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 ebenfalls mit nur 18 % mutierten Zellen (6 % ho und 12 % he) selten Mutationsereignisse.

Die Mutationsanalysen im Kodon 600 des *BRAF*-Gens zeigten sowohl für die Leukozyten also auch für die kolorektalen HT29-Einzelzellen hauptsächlich wt-Ereignisse (Abb. 33). Während für die isolierten Leukozyten wie erwartet in der Gesamtzellanalyse, als auch für die Einzelzellen keine *BRAF*-Mutation gefunden werden konnte, zeigen die Untersuchungen mit der humanen Zellkultur HT29 sehr heterogene Ergebnisse. In nur einer der 23 Einzelzellen (4 %) konnte die beschriebene heterozygote *BRAF*-Alteration gefunden werden. Eine homozygote Mutation konnte in 3 von 23 Fällen (13 %) analysiert werden. Für mehr als 80 % der Einzelzellen (83 %, 19 von 23 Fällen) zeigten die erhaltenen Chromatogramme ein wt-Ereignis auf. Hingegen konnte für die DNA aus dem Zellverband ein eindeutiger heterozygoter *BRAF*-Status detektiert werden.

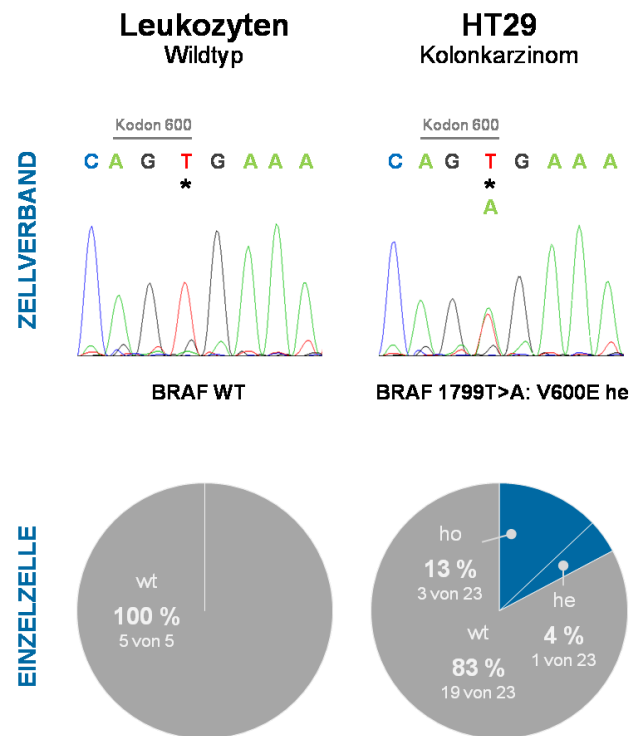


Abb. 33 Darstellung der ermittelten Mutationsraten des untersuchten *BRAF*-Gens von Einzelzellen im Vergleich zum Zellverband.

Die genetischen Analysen der Gesamtzell-DNA sowie in den Einzelzellen zeigten in der untersuchten humanen Tumorzelllinien HT29 die in der Literatur beschriebene heterogene (he) *BRAF*-Mutation im Kodon 600. Zusätzlich konnte in den Einzelzellen auch homozygote (ho) Ereignisse nachgewiesen werden. Die Leukozyten zeigten sowohl für die Gesamtzellanalyse als auch für die Einzelzelluntersuchungen keine genetischen Veränderungen.

Die Sequenzierungsanalysen der humanen Mammakarzinomzelllinie T47D für das Kodon 1047 im *PIK3*-Gen zeigte sowohl für die DNA aus dem Zellverband, als auch für die isolierten Einzelzellen die beschriebene Mutation. Für 80 % der Einzelzellen (20 von 25 Fällen) konnte die erwartete heterozygote Punktmutation gefunden werden. In 3 von 25 Fällen (12 %) lag eine homozygote Genveränderung vor. Lediglich 8 % der isolierten Zellen (2 von 25 Fällen) zeigten ein wt-Ereignis. Hingegen sind *PIK3*-Mutationen in den Einzelzellen, der als mutiert beschriebenen kolorektalen Karzinomzelllinie HCT-116, ähnlich selten nachzuweisen wie für das *KRAS*-Gen. Nur für die DNA aus dem Zellverband der Zelllinie konnte die beschriebene heterozygote Mutation gefunden werden. Die Leukozyten zeigten sowohl für die DNA bei der Gesamtzellanalyse, als auch für die isolierten Einzelzellen keine genetischen Veränderungen (Abb. 34).

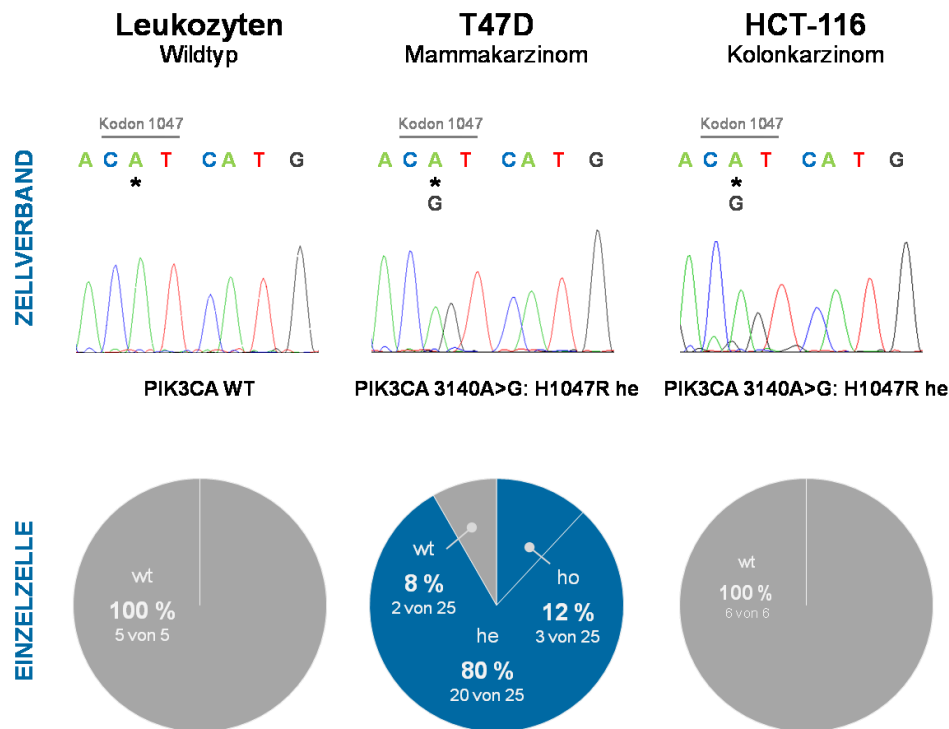


Abb. 34 Darstellung der ermittelten Mutationsraten des untersuchten *PIK3CA*-Gens von Einzelzellen im Vergleich zum Zellverband.

Die genetischen Analysen der Gesamtzell-DNA zeigten in beiden untersuchten humanen Tumorzelllinien die in der Literatur beschriebene *PIK3CA*-Mutation im Kodon 1047. Zusätzlich konnte in der Mammakarzinomzelllinie T47D die erwartete heterogene (he) Genveränderung zu 80 % ebenso in den Einzelzellen nachgewiesen werden. Wobei auch einzelne homozygote (ho) Ereignisse dokumentiert werden konnten. Für die kolorektale Zelllinie HCT-116 konnte keine mutierte Einzelzelle isoliert werden. Auch zeigten die Leukozyten sowohl für die Gesamtzellanalyse als auch bei den Einzelzelluntersuchungen den erwarteten Wildtyp-Status.

Werden die erhaltenen prozentualen Mutationsraten mit den in der Literatur beschriebenen Werten verglichen, fällt auf, dass nur für wenige der untersuchten Zelllinien der erwartete mutierte Anteil bestätigt werden konnte (Tab. 21). Die humanen Tumorzelllinien A549 und RPMI-8226 zeigten insgesamt eine ähnliche Mutationsrate wie in der Literatur beschrieben (Thomas et al., 2007), allerdings ist häufiger eine heterozygote Punktmutation in den isolierten Einzelzellen vertreten. Nur die humane Mammakarzinomzelllinie T47D zeigte mit einem erhaltenen heterozygoten Mutationsanteil von 80 % (insgesamt 92 % der Einzelzellen mutiert) ein vergleichendes Ergebnis zur Literatur (76 %; Thomas et al., 2007). Für die anderen untersuchten Zelllinien konnte die in der Literatur beschriebenen Mutationsraten nicht nachgewiesen werden und lagen deutlich unter den erwarteten Werten. Die gewonnen isolierten Einzelzellen der kolorektale Karzinomzelllinie HCT-116 lagen als Wildtyp vor, ebenso wie die Leukozyten aus dem Probandenmaterial.

Tab. 21 Vergleich der erhaltenen Mutationsrate der untersuchten Gene verschiedener Zellkulturen mit den in der Literatur beschriebenen Anteilen (Thomas et al., 2007).

<i>Zellen</i>	<i>Mutation</i>	<i>Analysierte Mutationsrate</i>	<i>Beschriebene Mutationsrate</i>
A549	KRAS G12S ho	61 % (25 % ho / 36 % he)	87 % ho
HCT-116	KRAS G13D he	100 % wt	74 % he
	PIK3CA H1047R he	100 % wt	42 % he
HT29	BRAF V600E he	17 % (13 % ho / 4 % he)	61 % he
MDA-MB-231	KRAS G13D he	18 % (6 % ho / 12 % he)	70 % he
Leukozyten	wt	100 % wt	100 % wt
RPMI-8226	KRAS G12A ho	53 % (21 % ho / 32 % he)	43 % ho
T47D	PIK3 H1047R he	92 % (12 % ho / 80 % he)	76 % he

(he – heterozygot, ho – homozygot, wt - Wildtyp)

Trotz der Differenzen zwischen den erwarteten und erhaltenen Mutationsereignissen bei den getesteten humanen Zelllinien konnte die Etablierung der Methode zur Mutationsanalysen auf Einzelzellniveau als erfolgreich bewertet werden. Im nächsten Schritt sollen Untersuchungen zu genetischen Veränderungen an Einzelzellen von Patienten durchgeführt werden.

4.2.2 Mutationsanalysen von Einzelzellen am Patienten

In etwa 40 % der nicht-familiär bedingten kolorektalen Karzinome werden onkogene *KRAS*-Mutationen gefunden (Finkelstein et al., 1993). Dabei werden in 98,4 % der Fälle die auftretenden Punktmutationen in Kodon 12 oder 13 beschrieben (Boughdady et al., 1992). Darüber hinaus ist bekannt, dass Metastasen kolorektaler Karzinome mit einer hohen Konkordanz dieselben Mutationen aufweisen wie die zugehörigen Primärtumoren. Diese Tatsache lässt die Annahme zu, dass im Blut dieser Patienten zirkulierende Tumorzellen mit derselben Mutation vorhanden sein sollten. Um die Vermutung zu stützen wurde ein Patient mit vorliegender *KRAS*-Mutation im Primärtumor auf die gleiche Genveränderung in einzelnen zirkulierenden tumorverdächtigen Zellen untersucht. Um die seltenen Tumorzellen von den Leukozyten abzutrennen, wurde auf die Magnet-basierte Anreicherungs-methode zurückgegriffen und die Probe nach dem dargestellten Verlaufsschema bearbeitet (Abb. 35). Das EDTA-Vollblut eines im *KRAS*-Gen mutierten Patienten wurde lysiert. Die aus einem ml Blut gewonnen Leukozyten wurden für die DNA-Isolation verwendet. In zwei weiteren Ansätzen wurden die Zellen mittels der MACS-Methode separiert. Während aus einem dieser Ansätze nach der magnetischen Separation die Zellen jeder Fraktion ebenfalls für die

Isolation der DNA verwendet wurden, wurde der zweite parallele Ansatz für die Isolation der tumorverdächtigen Einzelzellen aus der angereicherten Fraktion eingesetzt. Durch die Färbung der Zellen mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen EpCAM (Alexa Fluor 488-gekoppelt) konnte zwischen den einzelnen Zelltypen differenziert werden. Über eine zusätzliche Zellfärbung mit Propidiumiodid (PI) war eine Aussage über die Vitalität der Zelle möglich. Anschließend wurden mit Hilfe des Zellmanipulators AVISO-CellCelector epitheliale tumorverdächtige Einzelzellen aus der angereicherten Fraktion isoliert und die DNA gewonnen. An allen erhaltenen Proben (Einzelzellen, separierte und nicht-separierte Fraktion) wurden Mutationsanalysen mittels Sequenzierung durchgeführt. Eine Quantifizierung der vorhandenen CETCs erfolgte zuvor über die automatisierte Laser-Scanning-Mikroskopie am AVISO-CellCelector.

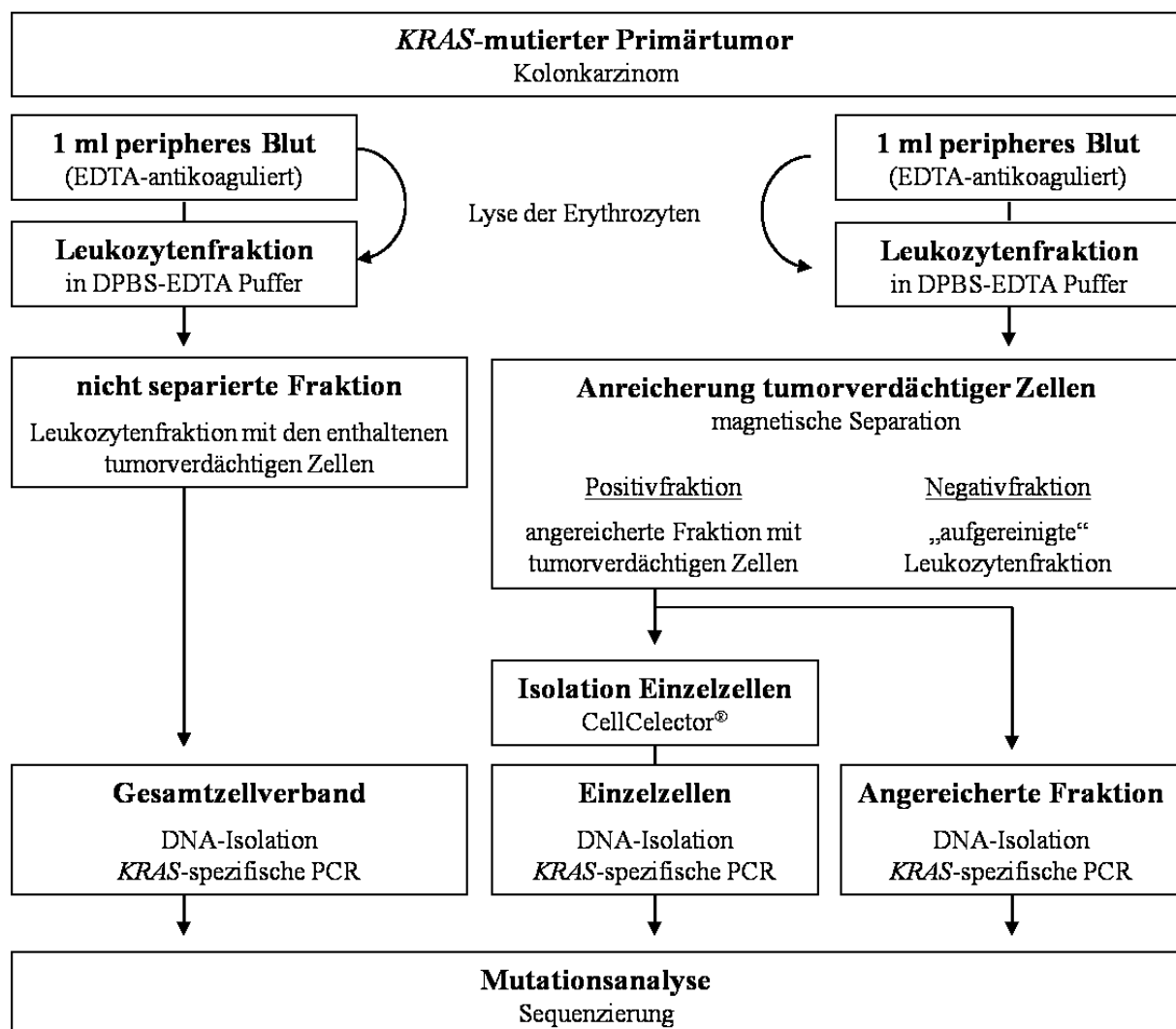


Abb. 35 Versuchsprotokoll zur Untersuchung des Mutationsstatus tumorverdächtiger Zellen bei Patienten mit *KRAS*-mutiertem Primärtumor.

Innerhalb der MiNa-CTC Studie konnten bisher 16 Vollblutproben kolorektaler Karzinompatienten untersucht werden. Für 37,5 % der Patienten (6 von 16 Fällen) wurde eine Mutation im *KRAS*-Gen diagnostiziert. Für einen der *KRAS*-mutierten Patient konnte eine Probe **vor** Beginn der Chemotherapie gewonnen werden und zeigte eine hohe Zahl EpCAM positiver Ereignisse (6.500 CETCs/ml Blut). Die verbleibenden *KRAS*-mutierten Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Studie bereits in Chemotherapie und wiesen nur wenige EpCAM positive Events auf (≤ 500 CETCs/ml Blut). Für die erstmalige Testung der Mutationsanalysen an Einzelzellen einer Patientenprobe wurde daher auf den im *KRAS*-Gen mutierten Kolonkarzinompatienten mit der höheren CETC-Zahl zurückgegriffen. Die über den Patienten bekannten klinischen Daten können aus nachfolgender Tabelle entnommen werden (Tab. 22). Bei der vorhandenen missense Mutation G12D kommt es im Kodon 12 im Exon 2 des *KRAS*-Gens zu einem Austausch einer einzelnen Base in der DNA (Substitution 35G>A). Bei der Translation führt diese sinnverändernde Mutation zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Asparaginsäure.

Tab. 22 Klinische Daten zum *KRAS*-mutierten Kolonkarzinompatienten.

Tumordiagnose:	Kolonkarzinom (ED 12/11)
Lokalisation:	Flexura hepatica (ICD-O 2: C18.3)
Histologie:	Adenokarzinom (M-1840/3)
	Grading: 2
	<i>KRAS</i> -mutiert im Exon 2, G12D
TNM-Klassifikation:	T2N0M0 (Stadium 1) (12/11)
Metachrone Fernmetastasen:	Leber (07/13)
	Lunge (07/13)
Therapie:	palliative Chemotherapie (FOLFOX6-Protokoll mit Oxaliplatin)

Die Bestimmung der Zellzahlen nach der MACS-Separation in den Fraktionen zeigte mit 6 % der Gesamtzellzahl in der Positivfraktion und 94 % Zellen in der negativen Fraktion keine Auffälligkeiten (Abb. 36 A). Bei dem Vergleich der Zellzahlen vor und nach der magnetischen Separation konnte eine sehr geringe Verlustrate von nur 1 % ermittelt werden (Abb. 36 C). Bei Betrachtung der Zelltypen in der separierten Fraktion fällt auf, dass lediglich 29 % der vorhandenen epithelialen tumorverdächtigen Zellen durch die CMD-umhüllten Partikel magnetisch beladen wurden (Abb. 36 B). Zusätzlich hatten 6 % der Leukozyten mit den Nanopartikel interagiert. Werden die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung der CETCs mit einbezogen, so ist festzustellen, dass der größere Anteil vitaler tumorverdächtige Zellen in der Negativfraktion vorliegen. Vor der Separation konnte ein Verhältnis von lebenden zu toten CETCs von 31/69 bestimmt werden. Ein vergleichbares Ergebnis konnte für die separierte

positive Fraktion erzielt werden (29/71; Abb. 36 D). Aufgrund der schwachen magnetischen Markierung der tumorverdächtigen Zellen durch die CMD-Partikel, konnte mittels der MACS-Separation lediglich ein Anreicherungsfaktor von 1,82 erzielt werden (Abb. 36 E).

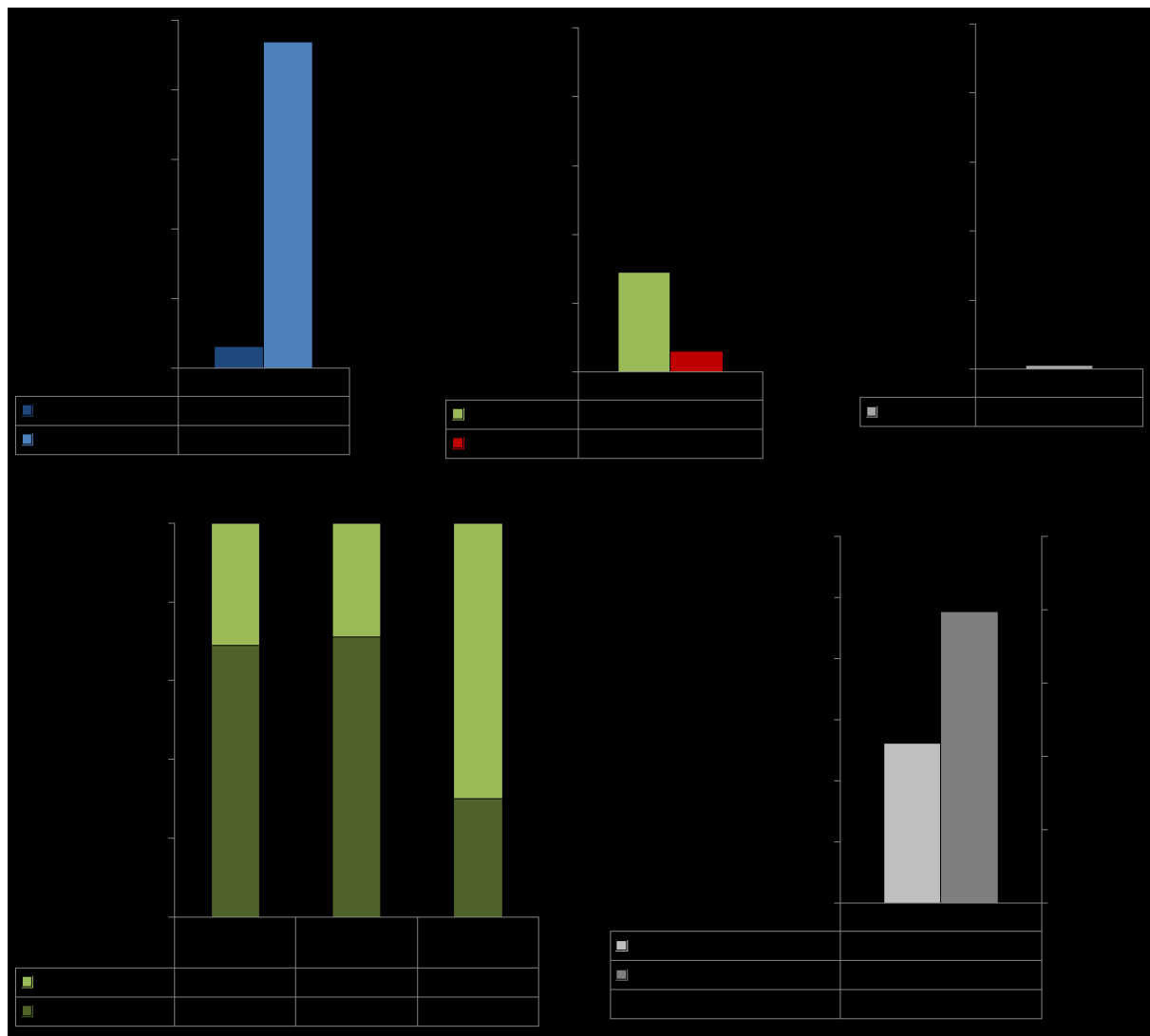


Abb. 36 Untersuchung der Nanopartikelinkubation auf das Aufnahmeverhalten der tumorverdächtigen Zellen des *KRAS*-mutierten Kolonkarzinompatienten.

(A) Zellzahlbestimmung in den separierten Fraktionen: bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation wurden nur 6 % der Zellen magnetisch markiert. **(B)** Bestimmung des CETC- bzw. Leukozytenverhältnisses nach der Anreicherung in der Positivfraktion (bezogen auf die Gesamtzellzahl der CETCs bzw. Leukozyten nach der Separation): bei Betrachtung der Zelltypen in der positiven Fraktion fällt auf, dass lediglich 29 % der ermittelten CETCs mit den magnetischen Partikeln wechselwirkten. Die Leukozyten zeigten mit 6 % eine deutlich schwächere magnetische Beladung. **(C)** Bestimmung des auftretenden Zellverlustes: bezogen auf die Gesamtzellzahl nach der Separation konnte eine sehr geringe Verlustrate von nur 1 % erzielt werden. **(D)** Vitalität der CETCs in den separierten Fraktionen: in der nicht-separierten Probe lagen nur 31 % der detektierten CETCs vital vor. Ähnlich dazu sah das Verhältnis der vitalen zu den apoptotischen CETCs in der Positivfraktion aus (29 % vitale CETCs). Dagegen konnten 70 % der CETCs in der Negativfraktion als vitale Ereignisse ermittelt werden. **(E)** Bestimmung des prozentualen Anteils der CETCs zur Gesamtzellzahl und der daraus ergebende Anreicherungsfaktor: der Anteil der tumorverdächtigen Zellen nach der Anreicherung konnte im Vergleich zur nicht-separierten Probe nahezu verdoppelt (Anreicherungsfaktor 1,82) werden (CETCs – zirkulierende epitheliale Tumorzellen; CRC – kolorektales Karzinom).

Trotz der schwachen Anreicherung der epithelialen Zellen in der positiven Fraktion, konnten aufgrund der deutlichen Abtrennung der Leukozyten eine Vielzahl tumorverdächtiger EpCAM positiver Einzelzellen gewonnen werden ($n = 50$, Abb. 37).

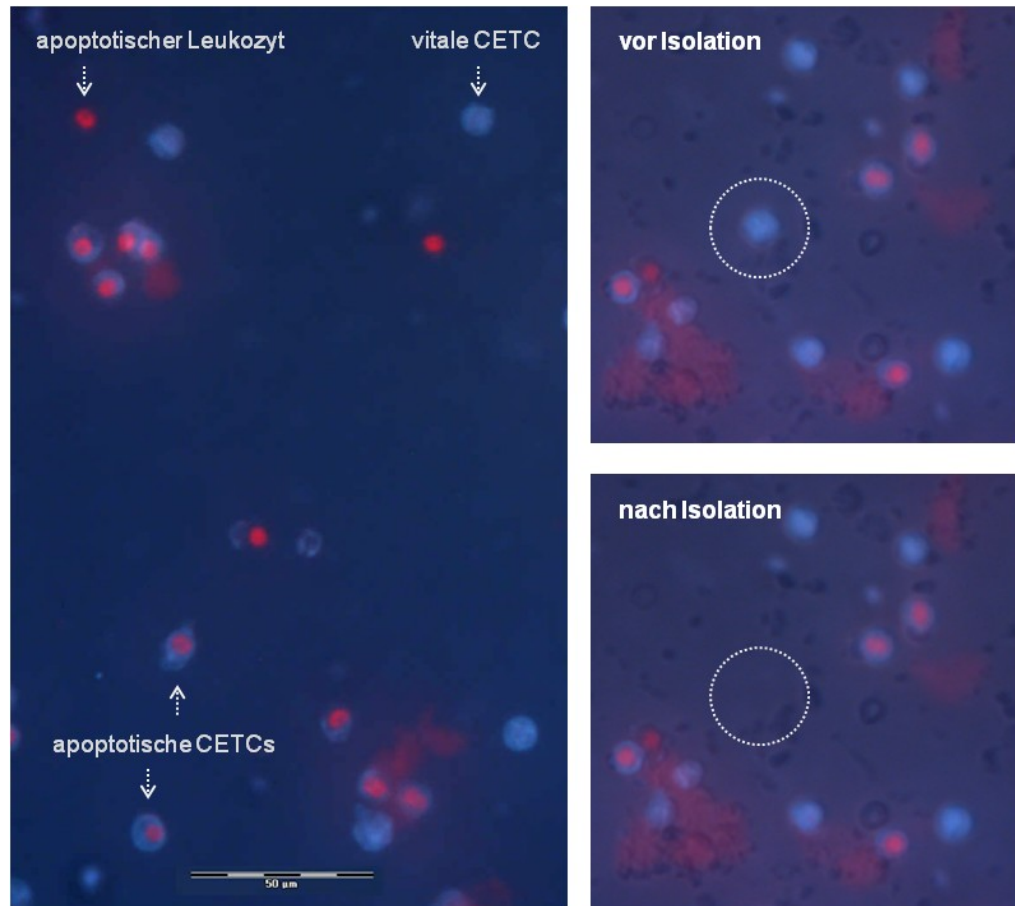


Abb. 37 Mikroskopische Aufnahmen der tumorverdächtigen EpCAM⁺ Zellen in der angereicherten Fraktion und deren erfolgreiche Isolation mit Hilfe des AVISO-CellCelector. Mittels Fluoreszenzmikroskopie (40x) konnten die tumorverdächtigen EpCAM⁺ Zellen (AlexaFluor-488 gelabelt) von Leukozyten (EpCAM⁻) unterschieden werden. Anschließend wurde mit Hilfe des AVISO-CellCelector Einzelzellen gewonnen (am Beispiel einer vitalen EpCAM⁺ Zelle dargestellt). Zusätzlich konnte mit einer Propidiumiodid-Färbung eine Aussage über die Vitalität der Zellen getroffen werden.

Da zunehmend auch EpCAM⁻ Zellen in den Fokus der Tumorzellforschung geraten (Mikolajczyk et al., 2011; Königsberg et al., 2001; Zhao et al., 2013), wurden zusätzlich zehn morphologisch auffallend größere EpCAM⁻ Zellen aus der angereicherten Fraktion isoliert. Die einzelnen Zellen wurden mit dem Zellmanipulator AVISO-CellCelector in ein Reaktionsgefäß überführt und für die weitere Verarbeitung bei -80°C gelagert. Hierbei wurden sowohl vitale, als auch tote Zellen gewonnen.

Die Sequenzierung der Einzelzellen zeigte für keine der 60 isolierten Zellen die gleiche genetische *KRAS*-Veränderung wie die des Primärtumors (35G>A: G12D), allerdings konnte eine weitere heterozygote Mutation detektiert werden (35G>C: G12A). Dass es sich bei der mutierten Einzelzelle um einer EpCAM negativen sowie PI positiven Zellen handelt, schließt nicht aus, dass diese Zelle keine Tumorzelle sein könnte. Bereits die vergrößerte Morphologie der ausgewählten Zelle gegenüber anderen EpCAM negativen Zellen war auffällig. Die detektierte Mutation befindet sich an der gleichen Position im Kodon 12 des *KRAS*-Gens, wobei es allerdings zu einem Austausch der Basen Guanin zu Cytosin und damit zu einer Substitution der Aminosäure Glycin zu Alanin kommt (Abb. 38).

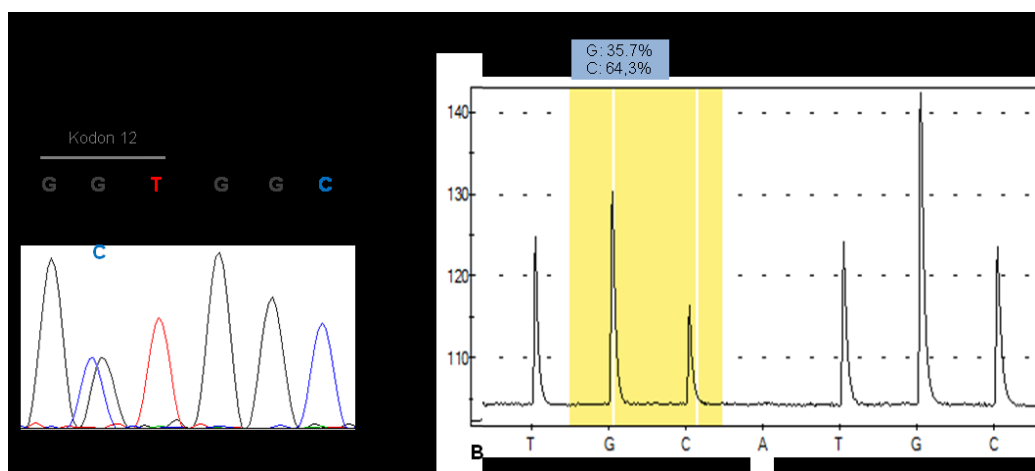


Abb. 38 Mutationsstatus der isolierten Einzelzelle sc59.

Mittels Sanger- und Pyrosequenzierung konnte die Mutation der gewonnen Einzelzelle sc59 detektiert werden. Das Chromatogramm (A) sowie das Pyrogramm (B) zeigen den Austausch der Basen Guanin zu Cytosin im Kodon 12 des *KRAS*-Gens. Die ermittelte heterogene (he) Mutation führt zur Substitution der Aminosäure Glycin zu Alanin (G12A).

Anschließend wurden mittels Sanger-Sequenzierung die separierten und nicht-separierte Probe auf die beiden *KRAS*-Mutationen untersucht. Für keine dieser Proben konnte eine genetische Veränderung detektiert werden. Zusätzlich war auch keine Detektion der beiden Mutationen in den separierten und der nicht-separierten Fraktionen mit Hilfe der sensitiveren Pyrosequenzierung möglich (Abb. 39).

Ein möglicher nächster Schritt wäre die Untersuchung von Metastasenmaterial auf die beiden Mutationen sowie die Analyse des Primärtumors auf die zusätzlich gefundene genetische Veränderung. Dadurch sollte eine Aussage möglich sein, ob es sich bei der G12A-Mutation um eine neu erworbene Mutation handelt oder eine im Primärtumor bereits vorhandene Genveränderung.

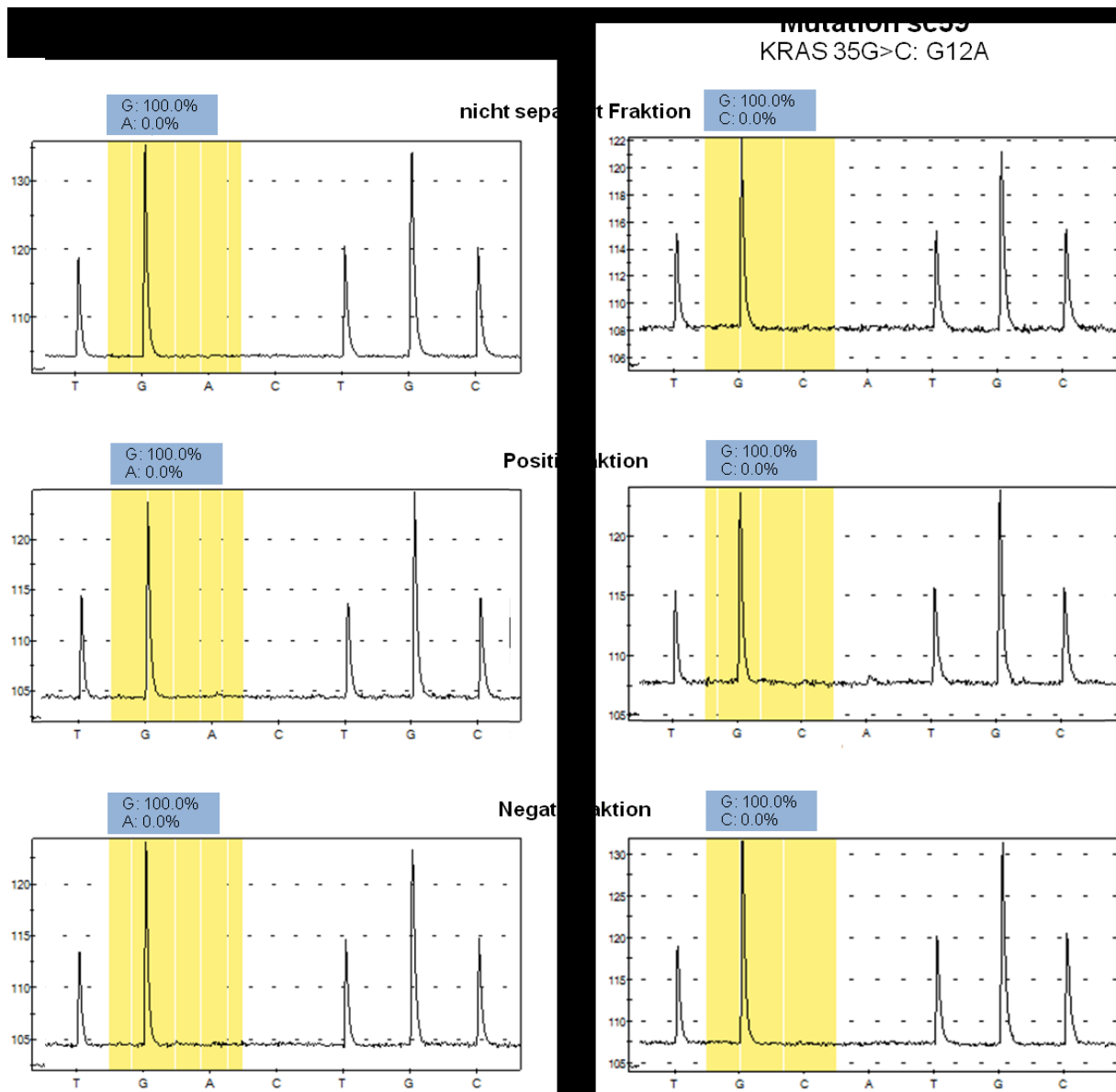


Abb. 39 Darstellung der Ergebnisse der Mutationsanalysen mittels Pyrosequenzierung.

Gezeigt werden die genetischen Untersuchungen der nicht-separierten und separierten Fraktionen nach den erwarteten Mutation des Primärtumors (G12D) und der neu entdeckten Mutation der Einzelzelle sc59 (G12A). Dabei konnte für keine der analysierten Proben eine der untersuchten Mutationen detektiert werden. Alle Fraktionen lagen als Wildtyp vor.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Mutationsuntersuchungen von Einzelzellen, sowohl an Zellen der Zellkultur sowie an hämatologischen Zellen, durchführbar sind. Zusätzlich scheint eine genetische Analyse der mittels Nanopartikel angereicherten tumorverdächtigen Zellen von Tumorpatienten erfolgsversprechend zu sein.

5 Diskussion

In den letzten Jahrzehnten konnte sowohl die Frühdiagnose, als auch die Therapie von Krebserkrankungen erheblich verbessert werden. Dadurch steigen die Überlebenschancen der Patienten deutlich. Dennoch löst der Befund einer Krebserkrankung bei den Betroffenen wie kaum eine andere Krankheit Ängste und Hoffnungslosigkeit aus. Im Jahr 2010 sind insgesamt 477.300 Menschen in Deutschland neu an Krebs erkrankt. Für das Jahr 2014 wird zwar weiterhin mit einem leichten Anstieg für die Rate der Neuerkrankungen gerechnet, allerdings geht die Zahl der Krebssterblichkeit in Deutschland seit Jahren zurück (Krebs in Deutschland 2009/2010). Durch die Fortschritte in der Therapie kann heute der überwiegende Teil der Betroffenen auf ein langes rezidiv- und beschwerdefreies Überleben hoffen. Für mehr als 90 % der tumorbedingten Todesfälle bei Patienten mit einem soliden Tumor liegt die Ursache in der Fernmetastasierung des Primärtumors (Christofori, 2006). Bereits frühzeitig in der Tumorgenese beginnen sich einzelne Zellen vom Primärtumor zu lösen, welche die Fähigkeit besitzen sich über das vaskuläre System im Körper zu verteilen und in entfernten Organen Metastasen zu bilden (Pantel und Brakenhoff, 2004). Daher geht die Gefahr, dass der Patient ein Rezidiv erleidet und der Krankheit erliegt, weniger vom Wachstum des Primärtumors aus, sondern vielmehr von der zeitigen Tumorzell dissemination und der damit verbundenen hämatogenen Streuung dieser Zellen. Sowohl die Tumorigenese, als auch die Dissoziation der Tumorzellen vom Tumorverband sind durch verschiedene Faktoren gekennzeichnet. Beispielsweise kann eine sukzessive Akkumulation von epigenetischen und genetischen Veränderungen zu einer Änderung der Gewebemorphologie und zu unkontrolliertem Zellwachstum führen (Fearon und Vogelstein, 1990). Gleichzeitig konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass lediglich 0,01 % der vom Primärtumor disseminierten Zellen Metastasen bilden, was die Metastasierung folglich zu einem äußerst ineffizienten Prozess macht (Weiss, 1990). Damit weisen nur sehr wenige Zellen die Kapazität zur unbegrenzten Proliferation und Metastasierung auf. Die als Ausgangspunkt einer hämatogenen Fernmetastasierung geltenden zirkulierenden Tumorzellen (CTC, *circulating tumor cell*) konnten bereits im Jahr 1869 im peripheren Blut eines metastasierenden Patienten nachgewiesen werden (Ashworth, 1869). Diese können dort über einen langen Zeitraum überleben (Pachmann, 2005). Aktuelle Studien und Forschungsergebnisse sprechen für eine hohe klinische und wissenschaftliche Relevanz des Nachweises von CTCs im Blut von Patientinnen mit Mammakarzinom (Pachmann et al., 2001; Pantel et al., 2003; Rack et al., 2010). So bietet die quantitative Bestimmung der zirkulierenden Tumorzellen die Möglichkeit einer Beobachtung des Therapieverlaufes, für die

es bislang keine vergleichbare Alternative gibt (Gasent Blesa et al., 2008). Darüber hinaus lassen die Detektion und Charakterisierung der molekularen Eigenschaften von CTCs eine Bewertung des Metastasierungsstatus sowie eine Rezidivprognose zu (Alix-Panabières und Pantel, 2013). Zusätzlich bietet die Erforschung dieser Zellen einen Einblick in den vielschichtigen Metastasierungsvorgang und neue Ansätze für innovative Therapien. Nicht zuletzt bedeutet die Untersuchung von CTCs in einer peripher gewonnenen Patientenblutprobe nur einen minimalen Eingriff mit geringem Infektionsrisiko (Slade et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit erfolgte der Nachweis der CTCs in Vollblutproben über das epitheliale Zelladhäsionsmolekül EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*). Die Zellen wurden daher als CTCs epithelialer Herkunft (CETC, *circulating epithelial tumor cell*) deklariert. Da eine EpCAM-Expression erfolgreich auf zirkulierenden Tumorzellen nachgewiesen werden konnte (Rao et al., 2005), ist die Detektion dieser Zellen mittels eines spezifischen Antikörpers gegen EpCAM als prognostischer Biomarker für Patienten epithelialer Karzinome von großem Interesse (Amato et al., 2013; Schulze et al., 2013). Aufgrund der geringen Häufigkeit der CETCs, zwischen den gesunden hämatogenen Zellen (eine CETC pro 10^3 bis 10^7 Leukozyten; Pachmann et al., 2001), bedarf eine erfolgreiche Detektion und Analyse hoch sensitive wie auch spezifische methodische Ansätze. Etablierte CETC-Detektionsverfahren basieren daher häufig auf einer vorangestellten Anreicherung von Tumorzellen im peripheren Blut. Hierbei existieren unterschiedliche Methoden, deren Prinzip auf biologischen sowie physikalischen Unterschieden zwischen den CETCs und Blutzellen beruht. Die zirkulierenden Tumorzellen können, aufgrund von Größen- oder Sedimentationsunterschieden, von den im Vergleich dazu kleineren Leukozyten abgetrennt werden (Zhe et al., 2011). Immunomagnetische Systeme benutzen zur CETC-Selektion Antikörper gegen Tumor-assoziierte Antigene (z.B. EpCAM, Positiv-Selektion) oder Leukozyten-Antigene (z.B. CD45, Negativ-Selektion; Alix-Panabières und Pantel, 2013). Das einzige von der FDA (*Food and Drug Administration*) zugelassene CETC-Detektionssystem *CellSearch*[®] (Veridex LLC, Johnson & Johnson, Warren, NJ, USA) basiert auf einem gegen EpCAM-gelabelten magnetischen Nanopartikel, um CETCs Magnetbasiert aus der Gesamtzellsuspension zu entfernen. Nachteilig bei dieser Methode ist die Betrachtung der reinen EpCAM⁺ Fraktion, da Zellen ohne entsprechenden Oberflächenrezeptor nicht in die Untersuchungen einbezogen werden. Aktuelle Untersuchungen demonstrieren, dass zunehmend auch EpCAM⁻ Tumorzellen in den Fokus der Forschung geraten (Mikolajczyk et al., 2011; Königsberg et al., 2001; Zhao et al., 2013). Eine Verbesserung in diese Richtung stellt das PowerMag-System dar, welches die Detektion von EpCAM⁺ und EpCAM⁻

zirkulierende Tumorzellen nach einer Leukozyten-Depletion mittels eines Antikörper-Nanopartikel-Komplexes gegen CD45 zulässt (Lin et al., 2013). Dennoch erfolgt auch hier die Selektion über einen zellspezifischen Oberflächenrezeptor. Für Antikörper-unabhängige magnetische Nanopartikel konnte gezeigt werden, dass eine rasche aktive Interaktion mit humanen Tumorzellen besteht (Treuel et al., 2013) und die daraus resultierende magnetische Beladung eine Magnet-basierte Separation dieser Zellen ermöglicht (Wagner et al., 2004). Interessanterweise konnte für Polysaccharid-umhüllte magnetische Nanopartikel (MNP) eine zelltypabhängige Aufnahmekinetik aufgedeckt werden (Clement et al., 2006), wobei humane Tumorzellen schneller mit Partikeln interagieren als normale hämatogene Zellen (Schwalbe et al., 2006b). Gegenwärtige Arbeiten weisen darauf hin, dass Tumorzellen gegenüber gesunden primären Zellen, wie Leukozyten, eine veränderte Struktur der äußeren Zellmembran aufzeigen (Goldenring et al., 2013; Zhao et al., 2013). CTCs scheinen mehr Galaktose auf der Zelloberfläche zu präsentieren (Zhao et al., 2013) und zusätzlich auch eine umfangreichere Glykokalix als normale Zellen aufzuweisen (Mitchell und King, 2014). Diese Unterschiede scheinen zur differenziellen Partikelaufnahme beizutragen. Untersuchungen zum Aufnahmeverhalten der MNP durch humane Zellen zeigten, dass die Größe der Partikel entscheidend für den Weg der zellulären Aufnahme ist. Während zu kleine (kleiner als 20 nm) Nanopartikel unspezifisch durch die Membran diffundieren, lagern sich zu große Partikel (größer als 500 nm), wenn überhaupt, einfach nur extrazellulär an. Die MNP im Größenbereich dazwischen werden vorwiegend mittels Endozytose in die Zelle internalisiert (Conner und Schmid, 2003). Ein weiterer Hauptfaktor für die Effektivität der Interaktion liegt in der Oberflächenmodifikation der MNP. Während einerseits sphärische Partikel effizienter aufgenommen werden als stäbchenförmige MNPs (Verma und Stellacci, 2010), spielt neben der Form auch die Ladung eine bedeutende Rolle. Für neutrale Dextran-umhüllte Nanopartikel wird keine internalisierende Wirkung in humane Zellen beschrieben (Villanueva et al., 2009). Dagegen binden kationische MNPs an negativ geladene Gruppen auf der Zelloberfläche und werden ausschließlich über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen (Harush-Frenkel et al., 2007). Ebenfalls über Endozytose, allerdings über unspezifische Bindungen an kationischen Bereichen der Plasmamembran, erfolgt die Internalisierung anionischer Nanopartikel (Verma und Stellacci, 2010). Äußere Einflüsse, wie Temperatur (Schwalbe et al., 2006b), Ionenstärke und pH-Wert des umgebenden Mediums, werden ebenfalls im Zusammenhang mit dem Wechselwirkungsverhalten zwischen Zelle und Partikel diskutiert (Clement et al., 2006). Zusätzlich wird ein positiver Einfluss auf die Interaktion für humanes Blutplasma beschrieben (Schwalbe et al., 2006b). Dabei wird davon ausgegangen,

dass die im Blutplasma vorhandenen extrazellulären Biomoleküle, wie Proteine, Zucker oder Lipide, eine Proteincorona um die Partikel bilden, wodurch diese schneller aufgenommen werden können (Treuel et al., 2013). Neben der Funktionalisierung des MNPs, dient eine Umhüllung auch zur Erhaltung der Stabilität, der biologischen Kompatibilität sowie der Degradierbarkeit (Singh et al., 2010). Nach außen negativ geladene Carboxymethyl-Dextran (CMD)-umhüllte MNP, mit einem hydrodynamischen Durchmesser von etwa 150 nm, eröffneten die Möglichkeit CETCs quantitativ aus dem peripheren Blut eines Patienten zu entfernen (Schwalbe et al., 2006a+b; Wagner et al., 2004). Um den Anreicherungseffekt der CETCs an Patientenproben genauer untersuchen zu können, sollte in ersten Versuchen die Wechselwirkung von humanen Zellen zu MNP, in Abhängigkeit vom Zelltyp und Hüllmaterial der Nanopartikel, geprüft werden. Ziel war die bestmögliche magnetische Markierung der CETCs innerhalb von 4 min und somit die Separation der Tumorzellen von den gesunden Leukozyten. Dabei sollte ein möglichst geringer Zellverlust erzielt werden. Nach der magnetischen Markierung der Zellen durch die MNP, erfolgte die Auftrennung der Proben am MACS-Separator (*Magnetic-Activated Cell Sorting*). Hierbei werden mittels einer Separationssäule im Magnetfeld die magnetisch markierten tumorverdächtigen Zellen (Positivfraktion) von den nicht beladenen Zellen abgetrennt (Negativfraktion). Sowohl für Tumorzelllinien, als auch für Proben von Mammakarzinompatienten konnte mittels der CMD Partikel eine erfolgreiche Anreicherung der Tumorzellen in der Positivfraktion erfolgen. Zunächst wurde der Unterschied zwischen verschiedenen Syntheseformen des CMD untersucht. Dabei konnte deutlich gezeigt werden, dass die Modifikation der funktionellen Gruppe der herkömmlichen Natriumsalz-Verbindung (CMD-Na) zur Säureform (CMD-H) sinnvoll ist. Sowohl für die humane Tumorzelllinie als auch für die CETCs aus EDTA-Vollblutproben von Karzinompatienten konnte eine wesentlich bessere magnetische Markierung der Zellen durch die CMD-H Partikel erzielt werden (90 % statt 87 % bzw. 73 % statt 48 %). Dabei zeigten die Leukozyten der Patienten eine deutlich schwächere Interaktion mit den Partikeln (ca. 4 %). Sowohl für die Versuche mit der Zellkultur, als auch am Patientenmaterial konnte ein positiver Effekt auf die Verlustrate der Zellen beobachtet werden. Neben CMD wurden weitere Polysaccharide als Hüllmaterialien für eine magnetische Anreicherung der Tumorzellen getestet und der Einfluss der Carboxymethylierung von Cellulose (CMC) und Pullulan (CMP) vergleichend geprüft. Nicht nur für die humane Tumorzelllinie (87 % bis 91 %), sondern auch für Patienten CETCs (85 % bis 91 %), konnte bei der Umhüllung mit verschiedenen carboxymethylierten Polysacchariden keine großen Unterschiede in der Markierung festgestellt werden. Hingegen zeigte die Umhüllung mit

CMD mit nur 7 % eine geringere Interaktionsrate für die Leukozyten als CMP (25 %) oder CMC (49 %). Eine höhere Wechselwirkungsrate der Leukozyten mit den MNPs würde keine zweckvolle Abtrennung der hämatogen Zellen bedeuten und sich damit auch negativ auf den Anreicherungseffekt der seltenen Tumorzellen auswirken. Zusätzlich zum selektiveren Interaktionsverhalten konnte für die CMD-umhüllten MNPs der geringste Zellverlust beobachtet werden. Da für die Testung der unterschiedlichen Umhüllungen das gleiche magnetische Fluid verwendet wurde, kann das entstehende Interaktionsmuster zu den Zellen auf das Hüllmaterial zurückgeführt werden. Dass die Art der Umhüllung einen Einfluss auf die Effektivität der zellulären Aufnahme hat wurde bereits mehrfach erfolgreich beschrieben (Treuel et al., 2013; Villanueva et al., 2009; Wotschadlo, 2009). Um bei der Separation der Patientenproben eine ausreichende Sensitivität zu gewährleisten und nachzuweisen, dass nur wenige Tumorzellen (5 % bis 0,05 %) zwischen vielen gesunden hämatogen Zell mittels CMD-umhüllten MNPs magnetisch markiert werden können, wurden verschiedene Verdünnungen von Tumorzellen und Leukozyten in Separationsversuchen getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch bei der höchsten Verdünnung der Tumorzellen eine sehr gute magnetische Beladung dieser Zellen innerhalb von 4 min möglich war, während die gesunden Leukozyten unabhängig vom prozentualen Anteil gleichbleibend schwach magnetisch markiert wurden.

Nachdem die magnetische Separationsmethode optimiert wurde, wurde der Anreicherungseffekt auf CETCs von zufällig ausgewählten Mammakarzinompatientinnen (n = 160) zu verschiedenen Therapiezeitpunkten untersucht. Insgesamt erfolgte die Separation an 390 Vollblutproben. Dabei wurden im Median 11 % aller Zellen durch die CMD-umhüllten Nanopartikel ausreichend magnetisch markiert und befanden sich nach der Separation in der positiven Fraktion. Für die Differenzierung zwischen den Zelltypen wurden die Proben nach der MACS-Separation mit dem epithelialen Marker Anti-EpCAM und dem Leukozytenmarker Anti-CD45 markiert. Durch die Färbung der Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern konnte die Verteilung der Zelltypen in den separierten Fraktionen betrachtet werden. In der Positivfraktion konnten im Median 80 % der epithelialen und damit tumorverdächtigen Zellen angereichert werden. Nur etwa 11 % der vorhandenen Leukozyten wurden ebenfalls mit den magnetischen Partikeln markiert. Somit wurden etwa 89 % der Leukozyten erfolgreich von den CETCs abgetrennt. Der Zellverlust der MACS-Separationsmethode lag im Median bei 16 % und ist auf die Säulenstruktur zurück zu führen. Die Füllung der Separationssäule mit Eisenoxidpartikeln stellt für die durchlaufende

Zellsuspension keine besonders zellschonende Variante dar, ist aber aufgrund der geringen Magnetizität der Nanopartikel nötig. Bei Betrachtung der prozentualen CETC-Anteile der einzelnen Patientenproben in der Positivfraktion konnte für 77 % der Fälle (300 von 390 Proben) eine magnetische Anreicherung der CETCs von mehr als 50 % erzielt werden. In mehr als 100 Fällen (101 von 390 Proben, 26 %) konnte sogar eine komplette magnetische Markierung der zirkulierenden epithelialen Zellen erreicht werden. Bei lediglich 3 % der separierten Patientenproben (12 von 390 Proben) hatte keine einzige CETC mit den umhüllten Nanopartikeln interagiert. Schwalbe und Kollegen konnten eine sehr gute Interaktionsrate der CETCs von Mammakarzinompatienten mit CMD-umhüllten Partikeln erzielen (Schwalbe et al., 2006b). Neu ist, dass die Anreicherung der tumorverdächtigen Zellen therapieabhängig zu sein scheint. Nachdem die Separationsergebnisse der Patienten nach ihrer jeweiligen Therapiesituation zum Zeitpunkt der Blutentnahme gruppiert wurden, konnten unterschiedliche Interaktionseffekte zwischen den umhüllten MNP und den CETCs in der Positivfraktion beobachtet werden. Während die tumorverdächtigen Zellen eines Patienten unmittelbar vor einer operativen Entfernung des Tumors eine sehr gute MNP-Markierung zeigten (100 % der CETCs in der Positivfraktion), konnte für die CETCs der Patienten, welche sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in einer Chemotherapie befanden, mit nur 54 % eine wesentlich schlechtere Interaktion zu den CMD-umhüllten MNP nachgewiesen werden. Die CETCs von Patienten vor sowie nach einer Bestrahlung zeigten eine ebenso gute Interaktionsrate mit den Nanopartikeln von mehr als 80 % wie die Patienten in Behandlung mit Trastuzumab und Zoledronsäure oder in der Nachsorge. Dagegen scheint die magnetische Markierung der Leukozyten von der jeweiligen Therapie unberührt zu bleiben. Weiterhin war auffällig, dass unabhängig von der Behandlung der Patienten der Anteil magnetischer Zellen in der positiven Fraktion nahezu konstant war (10 % bis 12 % der Gesamtzellen nach der Separation wurden magnetisch beladen). Da die Separationssäule für 1×10^7 magnetisch markierte Zellen bis zu 2×10^8 Zellen ausgelegt ist (Datenblatt *MS-Colums*, Miltenyi Biotec), sollte die Säulenkapazität nicht der limitierende Faktor sein. In diesem Zusammenhang wurde bereits beschrieben, dass die Verwendung einer größeren Separationssäule nicht mit einer Erhöhung angereicherter epithelialer Zellen einhergeht (Hekimian, 2012).

Durch das Einbeziehen der Gesamtzellzahl lässt sich eine Aussage über den prozentualen Anteil der CETCs in den Fraktionen treffen. Somit konnte auch der Anreicherungsfaktor bestimmt werden. Dadurch, dass für alle untersuchten Therapiesituationen eine erfolgreiche Anreicherung der CETCs erzielt werden konnte, wurde die Ausgangssituation für

weiterführende Untersuchungen der seltenen Tumorzellen deutlich verbessert. Im Schnitt konnte unabhängig von der Therapie ein Anreicherungsfaktor von 4,24 erzielt werden. Eine deutliche Abweichung von diesem Wert ist für die CETCs von Patienten nach einer Radiotherapie zu verzeichnen (2,17). Während durch die Bestrahlung die Gesamtzellzahl pro ml Blut um mehr als 20 % sank, stieg die Zahl der CETCs um mehr als das Dreifache an. Dennoch blieb die Gesamtzahl der magnetisch markierten Zellen in der Positivfraktion trotz Strahlentherapie gleich und auch der Anteil der beladenen CETCs unterschied sich kaum. Die drastische Abnahme des Anreicherungsfaktors ist daher auf den deutlichen Anstieg der CETC-Zahl, in der nicht-separierten Probe nach der Bestrahlung, zurück zu führen. Dabei ist darauf hin zu weisen, dass der größere Teil der untersuchten Patienten (17 von 21 Fällen) lediglich eine Bestrahlung, ohne vorherige Chemotherapie, erhalten hat. Durch eine Bestrahlung soll das Risiko eines Lokalrezidivs minimiert werden. Allerdings scheint die Zahl der epithelialen Zellen durch die Bestrahlung widererwartend zu steigen. Tinhofer und Kollegen veröffentlichten 2012 erstmals Daten, dass bei Plattenepithelkarzinompatienten von Hals und Kopf ein Strahlentherapie-induzierter Anstieg der CTC-Zahl zu verzeichnen ist, was zu einer systemischen Ausbreitung von Tumorzellen beiträgt (Tinhofer et al., 2012). Gleichzeitig konnte in einzelnen Fällen bereits vorher eine anhaltende Aktivierung des komplexen EGFR-Signalwegs beobachtet werden, wodurch der Zusammenhang zur Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) diskutiert wurde. Der EMT-Vorgang ist an der Invasion, Migration und anderen signifikanten Aspekten der Metastasierung beteiligt (Mani et al., 2008), wodurch epitheliale Marker wie EpCAM bei Tumorzellen in der Zirkulation verglichen zu primären Tumorgewebe herunter reguliert vorliegen (Rao et al., 2005). Resultierend aus dieser Tatsache entgehen EpCAM-basierte Nachweismethoden die CETCs, welche zum Zeitpunkt der Untersuchung einen mesenchymalen Phänotyp aufweisen (Sieuwerds et al., 2009). Weiter Studien sind hier von Nöten, um den durch die Strahlentherapie hervorgerufenen Anstieg der CETCs bewerten zu können.

Bei der genauen Betrachtung der Patienten unter Chemotherapie konnten Unterschiede, abhängig von der Chemotherapeutikakombination des Patienten, festgestellt werden. Mit Taxan-mono therapierte Patienten zeigten für die vorhandenen tumorverdächtigen Zellen eine bessere Interaktionsrate mit den CMD-umhüllten Nanopartikeln als Patienten, welche eine Kombinationstherapie (FEC - Fluorouracil/ Epidoxorubicin/ Cyclophosphamid, EC - Epidoxorubicin/ Cyclophosphamid) erhielten. Der gleiche Effekt wurde auch für den Anreicherungsfaktor der CETCs nach der MACS-Separation beobachtet. Um den Unterschied

der Anreicherung von CETCs im Verlauf einer Chemotherapie genauer beurteilen zu können, wurden an einer prospektiven Gruppe von Mammakarzinompatientinnen ($n = 7$) die Interaktion der CETCs mit den magnetischen Partikeln und die Vitalität der Zellen untersucht. Hierfür wurden Blutproben unmittelbar vor dem Beginn einer Behandlung sowie zu verschiedenen Zeitpunkten während und nach der Therapie separiert. Schon bei der Betrachtung der Gesamtzellzahl pro ml Blut fiel auf, dass durch die Chemotherapie 10 % bis 20 % weniger Zellen aus einem ml Blut gewonnen werden konnten als vor bzw. nach der Behandlung. Durch die Markierung der CETCs mit dem fluoreszierenden EpCAM-Antikörper konnte nach der MACS-Methode zwischen EpCAM⁺ und EpCAM⁻ Zellen in den separierten Fraktionen unterschieden werden. Während die Gesamtzellzahl in 1 ml Blut durch die Chemotherapie abzunehmen scheint, fiel die Reduktion der Zahl tumorverdächtiger Zellen während einer Behandlung unerwartet niedrig aus und stieg nach Abschluss der Therapie wider Erwarten schnell an. Alle untersuchten Patienten haben die Zytostatikabehandlung mit einer Kombinationstherapie begonnen und mit einer Taxantherapie, Paclitaxel bzw. Docetaxel, beendet. Die Beobachtung eines Anstieges der CETC-Zahl nach einer Behandlung mit Taxanen wurde bereits in der Literatur beschrieben (Camara et al., 2007). Zusätzlich verweisen aktuelle Untersuchungen für CTCs während einer Chemotherapie auf einen dynamischen Wechsel zwischen dem epithelialen und mesenchymalen Phänotyp (Yu et al., 2013). Während vor Beginn und nach Abschluss einer Behandlung hauptsächlich Tumorzellen mit mesenchymalen und nur wenigen epithelialen Eigenschaften detektiert werden konnten, zeigte die Untersuchung der gleichen Patientenprobe während der Therapie einen phänotypischen Wechsel der Zellen, wodurch die Zellen vermehrt epitheliale Merkmale trugen. Daher könnte die geringere Anzahl detektierter epithelialer Tumorzellen vor der Chemotherapie sowie die kaum merkliche Reduktion während der Behandlung und auch der Anstieg nach Ende der Therapie auf den alleinigen Nachweis der tumorverdächtigen Zellen mittels EpCAM zurück zu führen sein. Dennoch konnte für die CETCs aus den Proben vor Beginn sowie nach Abschluss der Chemotherapie eine sehr gute magnetische Markierung mittels CMD-umhüllter Nanopartikeln erzielt werden, während im Verlauf der Behandlung nur 12 % der CETCs mit den Partikeln interagierten. Das bedeutet, dass 88 % der tumorverdächtigen Zellen nach der Separation in der Negativfraktion vorlagen und nicht durch die Nanopartikel magnetisch markiert werden konnten. Dagegen blieb die Anzahl der Leukozyten in der Positivfraktion von der Therapie unabhängig konstant. Die erhaltenen Ergebnisse ließen bereits vermuten, dass der erhaltene Anreicherungsfaktor während einer Chemotherapie schwächer ausfallen wird als vor bzw. nach einer Therapie. Auch die

Untersuchung der Vitalität zeigte eine Reduktion bei den vitalen tumorverdächtigen Zellen durch die Chemotherapie. Durch die zusätzliche Färbung mit dem Apoptosemarker Propidiumiodid (PI) konnte der regressive Effekt auch für die Fraktionen nach der magnetischen Separation erfasst werden.

Eine signifikant schlechtere magnetische Markierung der tumorverdächtigen Zellen durch die CMD-umhüllten Nanopartikel während einer Chemotherapie konnte bei allen untersuchten Mammakarzinompatienten im direkten Verlauf der Behandlung beobachtet werden. Die Durchführung einer Zytostatikabehandlung zeigte in fast allen Fällen eine Reduktion der CETC-Zahl pro ml Blut und somit die erwartete apoptotische Wirkung der Chemotherapie auf die CETCs. Zusätzlich konnte für fast alle Patienten eine Abnahme in der Wechselwirkung der vorhandenen tumorverdächtigen Zellen zu den magnetischen Partikeln durch die Zytostatikabehandlung beobachtet werden. Wie auch bei der Untersuchung der einzelnen Chemotherapieformen zeigten einige Patienten gegenüber der Kombinationstherapie einen höheren prozentualen Anteil magnetisch markierter tumorverdächtiger Zellen sowie einen Anstieg der CETC-Zahl unter der Taxantherapie. Während der Nachbehandlung stieg der Anteil der magnetisch markierbaren CETCs in den bisher untersuchten Proben wieder an. Nach einer Behandlung mit verschiedenen Zytostatika konnte keine Anreicherung der CETCs erzielt werden. Dieser Effekt wurde ebenfalls bei *in vitro* Versuchen an humaner Zellkultur und Vollblutproben beobachtet. Eine Inkubation mit Cyclophosphamid führte gegenüber der Kontrollprobe zu einer verminderten magnetischen Markierung der Tumorzellen. Zusätzlich zeigte eine hämatogene Tumorzelllinie durch eine unterschwellige Langzeitinkubation eine Änderung der Zellmorphologie. Die charakteristische humane Suspensionszelllinie mit etwa 30 bis 50 % adhärent wachsenden Zellen zeigte nach der Inkubation mit einem Zytostatikum eine deutliche Reduktion des als Monolayer vorliegenden Zellanteils sowie für einige Zellen eine Komprimierung der Zellgröße. Eine Abnahme anheftender Zellen unter Zytostatikabehandlung wurde bereits bei der adhärent wachsenden Mammakarzinomzelllinie MCF-7 beschrieben (Kuznetsov et al., 2011). Dieser Effekt konnte auch für CETCs von Karzinompatienten während einer Chemotherapie erfasst werden und zeigte für einige EpCAM⁺ Ereignisse eine „Zellschrumpfung“ sowie Verdichtung der Zell- und Kernmembran. Hartmann und Kollegen konnten mittels Ramanspektroskopie eine Taxan-induzierte „Komprimierungsreaktion“, nach der Behandlung von MCF-7 Zellen mit Docetaxel, feststellen (Hartmann et al., 2012). Es wird davon ausgegangen, dass diese Zellen in einem mitotisch nicht-aktiven Zustand (G0-Phase) übergehen, um sich der Zytostatika-induzierten

Apoptose zu entziehen, da die meisten Zytostatika nur in einen stoffwechselaktiven Zellzyklus eingreifen können (Pantel et al., 1997). So besteht die Möglichkeit, dass diese Zellen die zeitlich begrenzte Chemotherapiephase im Organismus überleben und später für die Bildung von Fernmetastasen verantwortlich sein können. Diese „Komprimierungsfähigkeit“ der CETCs könnte eine mögliche Erklärung für die schlechtere magnetische Markierung der CETCs der Patienten darstellen, welche zum Separationszeitpunkt chemotherapiert waren. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass durch chemotherapeutische Behandlungen eine Änderung der Membranstruktur entsteht. Beispielsweise konnte durch Entzündungsprozesse eine Abnahme der Glykokalix-„Dicke“ von Tumorzellen in der Zirkulation nachgewiesen werden (Mitchell und King, 2014). Wiederrum konnte für anti-EpCAM gelabelte MicroBeads eine erfolgreiche magnetische Beladung „ruhender“ CETCs beschrieben werden (Pachmann et al., 2005b). Gleichzeitig beschrieben Mitchell und King jedoch, dass durch die Änderung der Glykokalix aufgrund äußerer Einflüsse die Anzahl verfügbarer Rezeptoren auf der Zelloberfläche erhöht wird und Adhäsionsliganden häufiger binden können (Mitchell und King, 2014). Die Aufnahme der anionischen CMD-umhüllten MNP erfolgt dagegen durch rezeptorunabhängige Endozytose (Verma und Stellacci, 2010; Wagner et al., 2004). Dennoch könnte mit Hilfe sogenannter Glyko-Arrays die extrazelluläre Plasmamembran von CETCs zum Zeitpunkt einer Chemotherapie untersucht und auf mögliche Unterschiede zu unbehandelten tumorverdächtigen Zellen geprüft werden. Ob durch die Umgestaltung der Glykokalix eine Minderung der magnetischen Markierbarkeit der CETCs auftritt bleibt zukünftigen Untersuchungen überlassen. Für die EpCAM⁺ tumorverdächtigen Zellen von Patienten während einer Behandlung mit Zoledronsäure oder Trastuzumab kann davon ausgegangen werden, dass keine oder nur geringe Veränderungen der Zelloberfläche durch die Therapie auftreten. Im Schnitt zeigten diese CETCs, wie die CETCs der Patienten vor der operativen Entfernung des Tumors oder in Nachsorge, eine gute bis sehr gute magnetische Anreicherung.

Aufgrund der schlechten magnetischen Markierung der Leukozyten und der sehr guten Interaktionsrate der epithelialen und damit tumorverdächtigen Zellen mit den CMD-umhüllten MNP ist davon auszugehen, dass durch die Partikel die gewünschten Zielzellen erfolgreich markiert wurden. Allerdings wurden durch die Fluoreszenzfärbung mit ausschließlich EpCAM nicht alle tumorverdächtigen Zellen nachgewiesen. Das FDA-genormte CETC-Detektionssysteme *CellSearch* definiert eine zirkulierende Tumorzelle aufgrund des Nachweises epithelialer Marker, EpCAM und Zytokeratin, in Kombination mit einer CD45-

Negativität. Zusätzlich werden mesenchymale Zellen als aggressive und klinisch relevante Subpopulation beschrieben (Yu et al., 2013) und sollten daher in zukünftige Untersuchungen mit einbezogen werden. Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass eine Überexpression verschiedener epithelialer Oberflächenproteine im Tumorgewebeschnitt nicht gleichzeitig auf die in der Zirkulation vorhandenen CETCs übertragen werden konnten (Berger, 2013). Im Zuge des EMT-Prozesses könnten die Tumorzellen ihre epithelialen Eigenschaften verloren haben und mesenchymale Charakteristiken aufweisen. Untersuchungen der letzten Jahre legen nahe, dass der EMT-Vorgang besonders Tumorzellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften betrifft (Mani et al., 2008). Als Subpopulation der CETCs werden Tumorstammzellen in einer Vielzahl von Untersuchungen für das Tumorwachstum verantwortlich gemacht (Al-Hajj et al., 2003; Diehn und Clarke, 2006; Fulda, 2013). Zwar wird auch das Adhäsionsmolekül EpCAM im Zusammenhang mit Stammzellverhalten beschrieben (Al-Hajj et al., 2003; Yamashita et al., 2013), dennoch sind für die Phänotypisierung der Tumorstammzellen zusätzliche Stammzell-assoziierte Biomarker, wie CD24, CD44 und CD133, von Nöten. Überdies zeichnen sich die Tumorstammzellen, neben ihrem hohen metastatischen Potenzial und ihrer Langlebigkeit, durch eine Resistenz gegenüber der Strahlen- und Chemotherapie aus (Al-Hajj et al., 2003; Diehn und Clarke, 2006; Nicolini et al., 2010). Folglich hängt die Wirksamkeit einer Therapie von der erfolgreichen Eliminierung dieser tumorinduzierten Stammzellen ab (Fehm et al., 2012; Shigdar et al., 2014). Da für chemotherapierte Patienten nur eine schwache magnetische Markierung der vorhandenen CETCs mittels CMD-umhüllter MNP erzielt werden konnte, bestätigt dies die Tatsache, dass sich die tumorverdächtigen Zellen während einer Zytostatikabehandlung der aktiven Zellteilung entziehen, um der apoptotischen Wirkung der Substanzen zu entgehen (Pantel et al., 1997). Dass es sich bei den beobachteten Zellen um Tumorstammzellen handeln könnte bleibt weiteren Analysen überlassen. Dennoch deutet sich an, dass die magnetische Anreicherungs-methode auch als ein prognostischer Marker für CETCs fungieren könnte. Durch eine Erweiterung der CETC-Detektion mittels zusätzlicher epithelialer Marker und der Betrachtung von mesenchymalen sowie stammzellähnlichen Eigenschaften könnte das Nachweisverfahren komplettiert werden. Allerdings kann eine Erhöhung der analytischen Sensitivität gleichzeitig zu einer Verminderung der analytischen Spezifität führen. Unter bestimmten pathologischen Bedingungen, wie entzündlichen Darmerkrankungen, können nicht-maligne Epithelzellen in den Blutkreislauf freigesetzt werden, was zu falsch-positiven Ergebnissen führt (Pantel et al., 2012). Daher sind genaue Untersuchungen zur Herkunft der zirkulierenden Tumorzellen nötig. Eine Kultivierung von isolierten humanen CETCs mit anschließender Injektion in immunsupprimierte Mäuse

ermöglicht beispielsweise eine Beurteilung der tumorigenen Eigenschaften (Ameri et al., 2010), aber auch eine Genotypisierung erlaubt eine genauere molekulare Charakterisierung der CETCs.

Nach der erfolgreichen Etablierung der magnetischen Anreicherungs-methode für tumorverdächtige Zellen mittels CMD-umhüllter Nanopartikel, sollte eine genetische Analyse der angereicherten Zellen folgen. Die Ergebnisse zur Quantifizierung der CETCs zu verschiedenen Therapiezeitpunkten, zeigte für die Gruppen der Patienten nach einer Bestrahlung sowie nach einer Behandlung mit Taxanen eine Zunahme der CETC-Anzahl pro Milliliter Blut. Genetische Untersuchungen dieser Zellen könnten einen Aufschluss über den unerwarteten Anstieg der CETC-Zahl zulassen und die Annahme, dass es sich dabei um Tumorzellen handelt, überprüfen. Darüber hinaus wurde für Patienten vor einer operativen Entfernung des Tumors, wie auch für Patienten in Nachsorge eine sehr gute magnetische Markierung der CETCs durch Dextran-umhüllte Nanopartikel erzielt. Die Genotypisierung der markierten Zellen könnte Auskunft über den Mutationsstatus der Zelle und somit auch über das mögliche Aggressivitätspotenzial geben. Es ist bekannt, dass durch Mutationen den Zellen ein maligner Charakter verliehen wird (Li et al., 2014). Die Mutationsanalysen der CETCs wurden mittels Sanger-Sequenzierung und Pyrosequenzierung durchgeführt. Modernere Ansätze der Sequenzierung bieten die Möglichkeit für Hochdurchsatz-Genotypisierung, welche als Forschungstool bei der Entdeckung von Schlüsselmutationen benutzt werden. Schon seit einigen Jahren wird intensiv nach genetischen Variationen gesucht, welche mit der Tumorentstehung und -progression assoziiert sind. Dadurch konnte für das Mammakarzinom eine absolute Mutationsrate von 36 % und bei kolorektalen Tumoren sogar von 50 % festgestellt werden (Thomas et al., 2007). Beide Tumorentitäten zeigten dabei verschiedene Mutationshäufigkeiten für die Onkogene *KRAS* (*kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) und *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*). Für das Mammakarzinom konnte das Gen *PIK3CA* mit einer Mutationsfrequenz von 25 % als häufigste Genalteration detektiert werden (Bachman et al., 2004). Bei kolorektalen Karzinomen ist eine genetische Veränderung im *KRAS*-Gen mit einer Häufigkeit von 40 % sehr verbreitet (Finkelstein et al., 1993). Darüber hinaus zeigte sich eine unerwartet hohe Anzahl von multiplen Mutationen. Diese Ergebnisse bestätigen die Erkenntnis, dass es sich bei einem Tumorgewebe nicht um eine einheitliche Zellmasse handelt. Vielmehr besteht der Tumor aus einer Vielzahl von funktionell unterschiedlichen Zellpopulationen. In Zeiten des

rasanten technologischen Fortschrittes ermöglichen immer sensitivere und spezifischere Verfahren eine umfassende Charakterisierung genetischer Variationen. Zudem bieten sie die Möglichkeit Tumoren differenzierter zu betrachten. Eine genaue Betrachtung des Phänotyps von CETCs aus dem peripheren Blut eines Karzinompatienten eröffnet, neben einem besseren Verständnis für die Metastasierung, ein mögliches Potenzial für die Weiterentwicklung der Krebstherapie. Da lediglich in einer kleinen Zellsubpopulation des heterogenen Zellgemisches Mutationen zu finden sein werden, war es erforderlich die genetischen Analysen auf Einzelzellniveau durchzuführen. Die Etablierung der Untersuchung genetischer Variationen in Einzelzellen erfolgte an humanen Tumorzelllinien, in welchen Mutationen für *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* bereits beschrieben werden konnten (Thomas et al., 2007). Für das *KRAS*-Gen werden homozygote (ho) sowie heterozygote (he) Alterationen im Kodon 12 und 13 für die humanen Karzinomzelllinien A549 (G12S ho), RPMI-8226 (G12A ho) als auch MDA-MB-231 (G13D he) untersucht. Eine genetische Veränderung im *KRAS*-Gen (G13D he) und zusätzlich eine *PIK3CA*-Mutation (H1047R he) wird für die Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 beschrieben. Die gleiche *PIK3CA*-Variation wird in der humanen Mammakarzinomzelllinie T47D erwartet. Auf eine beschriebene heterozygote Alteration im Kodon 600 des *BRAF*-Gens wurde die Kolonkarzinomzelllinie HT29 (V600E) analysiert. Als Wildtyp-Kontrolle für die untersuchten Genabschnitte wurden Leukozyten aus dem Vollblut eines Probanden gewonnen. Für die Mutationsuntersuchungen wurden Einzelzellen sowie DNA aus dem Gesamtzellverband isoliert. Der Nachweis der beschriebenen Genveränderung am Zellverband zeigte für alle untersuchten Zelllinien die erwartete Mutation. Bei den Einzelzellanalysen konnte lediglich für die humane Mammakarzinomzelllinie T47D (*PIK3CA* H1047 he) ein vergleichbares Ergebnis zur Literatur erzielt werden. Die Tumorzelllinie zeigte mit einem detektierten heterozygoten Mutationsanteil von 80 % (insgesamt 92 % der Einzelzellen mutiert) eine höhere Rate als beschrieben (76 % he; Thomas et al., 2007). Die malignen Zelllinien A549 und RPMI-8226 zeigten insgesamt eine ähnliche *KRAS*-Mutationsrate zur Literatur (87 % G12S bzw. 43 % G12A; Thomas et al., 2007). Allerdings war häufiger eine unerwartete heterozygote Punktmutation in den isolierten Einzelzellen vertreten. Für die anderen untersuchten Genveränderungen in den Zelllinien konnten die in der Literatur beschriebenen Mutationsraten nicht nachgewiesen werden oder lagen deutlich unter den erwarteten Werten. Überraschenderweise lagen alle isolierten Einzelzellen der Karzinomzelllinie HCT-116 als Wildtyp vor. Die Abweichung der Mutationsraten für die untersuchten Gene ist auf die unterschiedlich angewendeten Detektionsmethoden zurück zu führen. Die aus der Literatur recherchierten Werte wurden mittels massenspektrometrischer

Genotypisierung ermittelt. Während die hier angewendete Sanger-Sequenzierung der isolierten Einzelzellen den realen Mutationsstatus der gewonnenen Zelle wiedergibt, wurden die genetischen Untersuchungen von Thomas und Kollegen an DNA aus dem Zellverband durchgeführt (Thomas et al., 2007). Weitere Berichte über die ermittelte Diskrepanz bezüglich des genetischen Zustandes zwischen der Gesamtzellanalyse und den Untersuchungen der Einzelzellen humaner Zelllinien wurden bisher nicht beschrieben. Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wird als eine genetisch instabile humane Zelllinie beschrieben (Osborne et al., 1987), mit einem hypertriploiden bis zu hypotetraploiden Chromosomensatz (66 bis 87 Chromosomen). Generell könnte die differenzielle Häufigkeit der mutierten Einzelzellen auf den Ploidiegrad einer Zellkultur zurück zu führen sein. Während für die polyploide Kolonkarzinomzelllinie HCT-116 (Ploidie 6,8 %) keine mutierten Einzelzellen nachgewiesen werden konnten, zeigten die humanen Zelllinien T47D und A549 mit 92 % bzw. 64% eine hohe Zahl an Mutationsereignissen der isolierten Einzelzellen (Ploidie 0,8 % bzw. 0,4 %). Die einzelnen gewonnenen Leukozyten aus dem Probandenmaterial zeigten wie erwartet keine genetischen Änderungen für die untersuchten Genabschnitte. Insgesamt konnte die Optimierung der Mutationsanalysen auf Einzelzellniveau als erfolgreich bewertet werden. Neben der massenspektrometrischen Genotypisierung bieten Verfahren, wie die RT-PCR, eine Möglichkeit zur Untersuchung spezifischer Transkript-Charakteristika von Tumorzellen. Zwar können mit dieser Methode Transkripte Virus-induzierter Karzinome (Pfitzner et al., 2014) oder Fusionsproteine, beispielsweise BCR-ABL (Hochhaus et al., 1997), nachgewiesen werden, allerdings sind diese Verfahren nicht auf alle Tumorentitäten übertragbar. Um seltene zirkulierende Tumorzellen von Patienten verschiedener Karzinomerkrankungen untersuchen zu können ist eine unspezifische Markierung dieser Zellen mittels magnetischer Nanopartikel von großem Interesse. Die angereicherte Fraktion lässt anschließend umfangreiche Analysen zum Genom, Transkriptom sowie Proteom dieser Zellen zu.

Im Zusammenhang mit einem vom BMBF geförderten Verbundprojekt („MiNa-CTC“ - Erarbeitung eines mobilen mikrosystemtechnischen Gesamtsystems für Anreicherung, Nachweis und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen) werden magnetisch angereicherte Zellpopulationen von Mamma- als auch kolorektalen Karzinompatienten genetisch charakterisiert. Die molekularen Analysen erlauben hierbei ein spezifisches Therapiemonitoring sowie eine optimale Anpassung der Therapie für den jeweiligen Patienten. Da für Patienten des kolorektalen Karzinoms der Mutationsstatus des *KRAS*-Gens

im Primärtumor therapieentscheidend ist, wird dieser vor Behandlungsbeginn ermittelt. Diese Gruppe der Karzinompatienten bietet sich daher an, um Einzelzellen aus der magnetisch angereicherten Zellpopulation auf den bereits bekannten *KRAS*-Status zu überprüfen und so näher charakterisieren zu können. Zudem ist das Auftreten einer onkogene *KRAS*-Mutation beim kolorektalen Karzinom recht häufig vertreten. Genetische Alterationen werden in etwa 40 % der nicht-familiär bedingten kolorektalen Karzinome gefunden (Finkelstein et al., 1993). Dabei werden in 98,4 % der Fälle die auftretenden Punktmutationen in Kodon 12 oder 13 beschrieben (Boughdady et al., 1992), wobei mehr als 80 % der Mutationen allein in Kodon 12 lokalisiert sind (Roa et al., 2013). Innerhalb der MiNa-CTC Studie wurden Vollblutproben kolorektaler Karzinompatienten (n = 16) untersucht. Für 37,5 % der Patienten (6 von 16 Fällen) wurde eine Mutation im *KRAS*-Gen diagnostiziert. Lediglich für einen der Patienten konnte eine Probe vor Beginn der Chemotherapie gewonnen werden, welche eine hohe Zahl EpCAM positiver Ereignisse (6.500 CETCs/ml Blut) zeigte. Die verbleibenden im *KRAS*-Gen veränderten Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Studie bereits unter Chemotherapie. Die Vollblutproben dieser Patienten wiesen nur wenige EpCAM positive Ereignisse auf (≤ 500 CETCs/ml Blut) und wurden von den Mutationsanalysen der Einzelzellen ausgeschlossen. Weiter konnte in der aktuellen Literatur belegt werden, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit die gleiche *KRAS*-Mutation im Primärtumor auch in der Metastase wiedergefunden werden kann. Miranda und Kollegen zeigten für Patienten des kolorektalen Karzinoms, dass mit einer Übereinstimmung von mehr als 80 % eine *KRAS*-Mutation im Kodon 12 in Metastasen der Lymphknoten auch in der Leber detektiert werden konnte (Miranda et al., 2013). Dies lässt die Annahme zu, dass im Blut dieser Patienten zirkulierende Tumorzellen mit derselben genetischen Veränderung vorhanden sein könnten. Die Vermutung konnte durch aktuelle Untersuchungen einzelner Arbeitsgruppen bestätigt werden. Beispielsweise wurde eine Konkordanz zwischen *KRAS*-Mutationen in zirkulierenden Tumorzellen und dem Primärtumor aufgezeigt (Fabbri et al., 2013). Zusätzlich wurde eine Verknüpfung vom *KRAS*-Mutationsstatus des Primärtumors mit dem Vorhandensein disseminierter Tumorzellen diskutiert. Während für mehr als die Hälfte der Patienten mit einer *KRAS*-Mutation CTCs nachgewiesen werden konnten, war dies nur für ein Drittel der Patienten ohne diese Genveränderung im Primärtumor belegbar. Somit liegt die Vermutung nahe, dass Patienten mit einer genetischen Änderung im *KRAS*-Gen möglicherweise eher zur Metastasenbildung neigen.

Bei dem für die Mutationsanalysen der Einzelzellen ausgewählten Kolonkarzinompatienten kann diese Hypothese unterstützend belegt werden. Im Primärtumor des Patienten lag eine *KRAS*-Mutation vor (G12D) und der Nachweis zirkulierender tumorverdächtiger Zellen im Vollblut des Patienten war ebenfalls erfolgreich. Zusätzlich wurden knapp zwei Jahre nach der Erstdiagnose Fernmetastasen in den Organen Leber und Lunge festgestellt. Bei der im Adenokarzinom vorhandenen *KRAS*-Mutation G12D handelt es sich um eine prävalente Mutation. Dabei kommt es zu einem Austausch einer einzelnen Base (35G>A), welche bei der Translation zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Asparaginsäure führt. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 31 % tritt diese genetische *missense* Mutation am häufigsten bei kolorektalen Karzinomen auf (Janku et al., 2011). Um die seltenen, eventuell mutierten, zirkulierenden Tumorzellen von den Leukozyten abzutrennen, wurde auf die Magnet-basierte Anreicherungsmethode zurückgegriffen. Durch die CMD-umhüllten Nanopartikel wurden 6 % der vorhandenen Zellen magnetisch markiert und befanden sich nach der MACS-Separation in der Positivfraktion. Mit nur 1 % Zellverlust konnte eine sehr schonende magnetische Anreicherung durchgeführt werden. Durch eine anschließende Färbung der Zellen mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen EpCAM (Alexa Fluor 488-gekoppelt) konnte abermals zwischen den einzelnen Zelltypen, EpCAM⁺ oder EpCAM⁻ Zellen, nach der Separation differenziert werden. Über eine zusätzliche Zellfärbung mit Propidiumiodid (PI) war eine Aussage über die Vitalität der Zelle möglich. Bei Betrachtung der Zellarten in der separierten Fraktion fällt auf, dass lediglich 29 % der vorhandenen epithelialen tumorverdächtigen Zellen durch die CMD-umhüllten Partikel magnetisch beladen wurden. Werden die Ergebnisse der Vitalitätsbestimmung der CETCs mit einbezogen, so ist festzustellen, dass vor der Separation ein Verhältnis von lebenden zu toten CETCs von 31/69 bestimmt werden konnte. Ein vergleichbares Ergebnis wurde für die separierte positive Fraktion erzielt (29/71). Aufgrund der schwachen magnetischen Markierung der EpCAM⁺ Zellen durch die CMD-Partikel, konnte mittels der MACS-Separation lediglich eine knappe Verdopplung der CETCs in der positiven Fraktion erzielt werden (Anreicherungsfaktor 1,82). Dennoch konnten aufgrund der deutlichen Abtrennung der Leukozyten eine Vielzahl tumorverdächtiger EpCAM⁺ Einzelzellen gewonnen werden (n = 50). Da zunehmend auch EpCAM⁻ Zellen in den Fokus der Tumorzellforschung geraten (Mikolajczyk et al., 2011; Königsberg et al., 2001; Zhao et al., 2013), wurden zusätzlich zehn morphologisch auffallend größere EpCAM⁻ Zellen aus der angereicherten Fraktion isoliert. Dabei wurden sowohl vitale, als auch tote Zellen gewonnen und anschließend die DNA aus den einzelnen Zellen isoliert. Die Sequenzierung der Einzelzellen zeigte für keine der 60 isolierten Zellen die gleiche

KRAS-Mutation wie die des Primärtumors (35G>A: G12D). Allerdings konnte für eine EpCAM⁻/PI⁺ Zelle eine weitere heterozygote Mutation detektiert werden (35G>C: G12A). Diese *missense* Mutation befindet sich an der gleichen Position im Kodon 12 des *KRAS*-Gens, wobei es allerdings zu einem Austausch der Basen Guanin zu Cytosin und damit zu einer Substitution der Aminosäure Glycin zu Alanin kommt. Diese genetische Veränderung gehört mit einer Wahrscheinlichkeit von 3 % bis 5 % zu den häufig auftretenden *KRAS*-Mutationen bei kolorektalen Karzinompatienten (Januk et al., 2011; Roa et al., 2013; Wang et al., 2012). Die Tatsache, dass es sich bei der mutierten Einzelzelle nicht um eine EpCAM⁺ Zelle handelt, schließt damit nicht aus, dass diese Zelle eine tumorverdächtige Zelle ist. Durch die Dedifferenzierung der CETCs kann die Zelle bei der Invasion ins Blutgefäßsystem ihren epithelialen Phänotyp verlieren. Die EpCAM-Expression der CTCs im Blut ist runter reguliert (Joosse und Pantel, 2013). Zudem wird für CTCs von einer häufigen Änderung zwischen dem epithelialen und mesenchymalen Charakter berichtet (Yu et al., 2013). Dennoch unterlaufen einige der epithelialen Zellen den EMT-Vorgang und treten über passive Prozesse in den Blutstrom ein (Friedl und Alexander, 2011). Für diese disseminierten Zellen werden unter anderem in der Literatur EpCAM/Zytokeratin⁺ Eigenschaften beschrieben (Zhao et al., 2013). Daher könnte es sich bei der detektierten EpCAM⁻ mutierten Einzelzelle sc59 um eine epitheliale Zelle handeln, welche lediglich positiv für Zytokeratin ist. Denkbar wäre auch, dass es sich um eine dedifferenzierte Zelle nach dem EMT-Prozess handelt, welche einen mesenchymalen Phänotyp aufzeigt. Darüberhinaus werden mesenchymale Zellen als aggressive und klinisch relevante Subpopulation beschrieben (Yu et al., 2013). Die erfolgreiche magnetische Beladung dieser Zelle mit den CMD-umhüllten Nanopartikeln spricht ebenfalls für eine schnell proliferierende Zelle, welche durch ihren erhöhten Membranumbau einen tumorverdächtigen Charakter aufweist. Generell zeigen die Mutationsanalysen für Einzelzelluntersuchungen von zirkulierenden Tumorzellen bei metastasierten Patienten noch ein sehr heterogenes Bild. Die Arbeitsgruppen von Mostert sowie Gasch konnten beim kolorektalen Karzinom keine Übereinstimmung beim Mutationsstatus der zirkulierenden Tumorzellen zum Primärtumor feststellen (Mostert et al., 2013; Gasch et al., 2013). Heitzer und Kollegen wiederum detektierten *KRAS*- und *PIK3*-Mutationen, welche im Primärtumor und in den Metastasen gefunden wurden, ebenfalls in entsprechenden Tumorzellen im Blut (Heitzer et al., 2013). Neben den Einzelzellen wurde zusätzlich in zwei weiteren Ansätzen die DNA aus einer nicht-separierten Probe sowie nach der MACS-Separation aus der Positiv- und Negativfraktion gewonnen. Mittels Sanger-Sequenzierung konnte für keine dieser DNA Proben eine der beiden Mutationen (G12D oder

G12A) detektiert werden. Daher wurden die Proben zusätzlich durch Pyrosequenzierung auf die erwarteten Genveränderungen untersucht. Diese Art der Sequenzierung bietet die Möglichkeit Häufigkeiten bestimmter Genmutationen zu bestimmen. Da hierbei die Position und Art der Mutation vorher bekannt sein muss, kann eine höhere Sensitivität erzielt werden. Dennoch konnte auch mit Hilfe der sensitiveren Sequenzierungsmethode keine Mutation in den separierten Fraktionen oder der nicht-separierten Probe detektiert werden. Das in der Positivfraktion keine Mutation detektiert werden konnte, könnte auf die schlechte magnetische Anreicherung der tumorverdächtigen Zellen (nur 30 % der Zellen) mit den CMD-umhüllten MNP zurück zu führen sein. Einen positiven Einfluss auf die Interaktion zwischen CETCs und Nanopartikel wird für die Zugabe von humanem Blutplasma beschrieben (Schwalbe et al., 2006b; Treuel et al., 2013). In *in vitro* Versuchen konnten dadurch die magnetische Markierung der CETCs erhöht und der zeitliche Rahmen der Abtrennung von CETCs von den gesunden Leukozyten vergrößert werden. Zusätzlich scheint sowohl die Sensitivität der Sanger-Sequenzierung (~ 15 - 10 %), als auch die der Pyrosequenzierung (~ 5 %), nicht ausreichend für die Untersuchung gewesen zu sein. Ein denkbarer nächster Schritt wäre die Untersuchung der Metastase auf die beiden Mutationen sowie die Analyse des Primärtumors auf die in der Einzelzelle detektierte Mutation. Dadurch sollte eine Aussage möglich sein, ob es sich bei der G12A Mutation um eine neu erworbene Mutation handelt oder eine im Primärtumor bereits vorhandene Genveränderung. Eine Aussage diesbezüglich bleibt zukünftigen Analysen überlassen. Heitzer und Kollegen beispielsweise konnten mittels nachträglichem *Deep Sequencing* genetische Veränderungen, von zunächst „neu entdeckten“ Mutationen in CTCs, auch auf subklonaler Ebene im entsprechenden Primärtumor und Metastasenmaterial nachweisen (Heitzer et al., 2013). Diese Studie könnte den Weg ebnen, zirkulierende Tumorzellen bei Krebspatienten als effektive Möglichkeit der Überwachung des Tumorgenoms während der Progression, der Therapie und bei einem Rezidiv zu nutzen. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob durch Mutationsanalysen von einzelnen Zellen Rückschlüsse auf das Tumorgeschehen geschlossen werden können.

Zusammenfassend konnte an einem großen Patientenkollektiv gezeigt werden, dass eine magnetische Anreicherung epithelialer tumorverdächtiger Zellen mittels Dextran-umhüllter Nanopartikel innerhalb kürzester Zeit erfolgreich durchgeführt werden konnte. Dabei war erstmals ein therapieabhängiger Anreicherungseffekt nachweisbar. Die erhaltenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die magnetische Anreicherungsmethode als prognostischer

Marker für CETCs etabliert werden könnte. Zusätzlich ermöglicht die deutliche Abtrennung der Leukozyten weitere molekulare Analysen der seltenen Tumorzellen. Beispielsweise können Genomanalysen an der angereicherten Fraktion durchgeführt werden, um ein spezifisches Therapiemonitoring sowie eine optimale Anpassung der Therapie an den jeweiligen Patienten zu erlauben. Die Untersuchungen zum Mutationsstatus konnten erfolgreich auf Einzelzellniveau, sowohl an Zellen der Zellkultur als auch an hämatologischen Zellen, etabliert werden. Somit scheint eine genetische Analyse der mittels Nanopartikeln angereicherten tumorverdächtigen Zellen eines Karzinompatienten erfolgsversprechend zu sein.

6 Ausblick

Zirkulierende Tumorzellen sind für die Bildung von Metastasen verantwortlich und stellen einen wichtigen diagnostischen wie auch therapeutischen Angriffspunkt für die Behandlung von Karzinompatienten dar. Die Quantifizierung sowie die Charakterisierung der zirkulierenden Tumorzellen (CTCs, *circulating tumor cells*) sollen Möglichkeiten eröffnen den Behandlungsverlauf eines Patienten zu überwachen, aber auch die Therapie optimal an den Patienten anzupassen. Die Erforschung dieser Zellen wird einen Einblick in den vielschichtigen Metastasierungsprozess geben und neue Ansätze für innovative Therapien ermöglichen.

Voraussetzung dafür ist die Detektion aller vorhandenen Tumorzellen. Es besteht die Annahme, dass nicht alle CTCs mit den heutigen Methoden erfasst werden und einige Zellen der derzeitigen Detektion entkommen (Alix-Panabières und Pantel, 2013). Neben epithelialen Markern, wie EpCAM und Zytokeratin, sollten deshalb auch mesenchymale Marker in zukünftige Untersuchungen eingeschlossen werden, da Zellen mit mesenchymalem Phänotyp als aggressive und klinisch relevante Subpopulation beschrieben wurden (Alix-Panabières und Pantel, 2013; Yu et al., 2013). Im Zuge der Epithelial-Mesenchymalen-Transition (EMT) verlieren Tumorzellen ihre epithelialen Eigenschaften und gewinnen mesenchymale Charakteristika. Besonders Tumorzellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften sind von der EMT betroffen (Mani et al., 2008). Als Subpopulation der CTCs werden Tumorstammzellen in einer Vielzahl von Untersuchungen für das Tumorwachstum verantwortlich gemacht (Al-Hajj et al., 2003; Diehn und Clarke, 2006; Fulda, 2013). Daher liegt die Zukunftsperspektive der CTC-Detektion in der Identifikation geeigneter Marker, um alle Tumorzellen zu erfassen und darüber hinaus das metastatische Potenzial jeder einzelnen CTC zu spezifizieren.

Aufgrund der geringen Häufigkeit der zirkulierenden Tumorzellen inmitten der gesunden hämatogenen Zellen, bedarf eine erfolgreiche Detektion und Analyse hoch sensitiver wie auch spezifischer methodischer Ansätze. Etablierte CTC-Detektionsverfahren basieren daher häufig auf einer vorangestellten Anreicherung von Tumorzellen aus peripherem Blut (Alix-Panabières und Pantel, 2013). Um die phänotypisch unterschiedlichen CTCs untersuchen zu können ist eine eher unspezifische Markierung dieser Zellen eine interessante Option. Für Dextran-umhüllte magnetische Nanopartikel konnte eine sehr gute Interaktion mit tumorverdächtigen Zellen beschrieben werden (Wagner et al., 2004; Schwalbe et al.,

2006a+b). Neu ist der nachgewiesene therapieabhängige magnetische Anreicherungseffekt von CTCs, welcher zukünftig als prognostischer Marker für die Detektion von CTCs fungieren könnte. Da für chemotherapierte Patienten nur eine schwache magnetische Markierung der vorhandenen CTCs erzielt werden konnte, bestätigt dies die Annahme, dass sich die tumorverdächtigen Zellen während einer Zytostatikabehandlung der aktiven Zellteilung entziehen, um der apoptotischen Wirkung der Substanzen zu entgehen (Pantel et al., 1997). So besteht die Möglichkeit, dass diese Zellen die zeitlich begrenzte Chemotherapiephase im Organismus überleben und später für die Bildung von Fernmetastasen verantwortlich sein könnten. Untersuchungen zur Zellzyklus-Verteilung der CTCs zu verschiedenen Therapiezeitpunkten könnten hier weiteren Aufschluss geben. Darüber hinaus werden Unterschiede in der Struktur der äußeren Zellmembran von Tumorzellen gegenüber gesunden primären Zellen, wie Leukozyten, aufgezeigt (Goldenring et al., 2013; Zhao et al., 2013). CTCs präsentieren mehr Galaktose auf der Zelloberfläche (Zhao et al., 2013) und weisen zusätzlich auch eine umfangreichere Glykokalix als normale Zellen auf (Mitchell und King, 2014). Mit Hilfe sogenannter Glyko-Arrays könnte die extrazelluläre Plasmamembran von CTCs während verschiedener Therapiesituationen untersucht werden. Generell konnte für alle untersuchten Therapiezeitpunkte eine Anreicherung der tumorverdächtigen Zellen erzielt werden. Somit wurde die Ausgangssituation für anschließende Genom-, Transkriptom- oder Proteomanalysen dieser seltenen Zellen deutlich verbessert.

Die Genotypisierung der magnetisch angereicherten Zellen wird zukünftig Auskunft über den Mutationsstatus der Zelle und somit auch über das mögliche Aggressivitätspotenzial geben (Li et al., 2014). Schon seit einigen Jahren wird intensiv nach genetischen Variationen gesucht, welche mit der Tumorentstehung und -progression assoziiert sind. Immer sensitivere und spezifischere Verfahren ermöglichen eine umfassende Charakterisierung genetischer Variationen. Zudem bieten sie die Möglichkeit, Tumoren differenzierter zu betrachten. Da es sich bei Tumorgewebe nicht um eine einheitliche Zellmasse handelt, sondern diese aus einer Vielzahl funktionell unterschiedlicher Zellpopulationen besteht, sind genetische Analysen auf Einzelzellniveau erforderlich. Die Tatsache, dass es Übereinstimmungen zwischen dem Mutationsstatus vom Primärtumor und Metastase gibt (Miranda et al., 2013), stützt die Hypothese, dass im Blut dieser Patienten zirkulierende Tumorzellen mit derselben genetischen Veränderung vorhanden sein könnten. Zusätzlich wird eine Verknüpfung vom Mutationsstatus des Primärtumors mit dem Vorhandensein disseminierter Tumorzellen

diskutiert (Fabbri et al., 2013) und vermutet, dass Patienten mit bestimmten genetischen Veränderungen möglicherweise eher zur Metastasenbildung neigen. Darüber hinaus ist bekannt, dass in der Krankheitsentstehung neben Mutationen auch epigenetische Veränderungen eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine initiale genetische Veränderung des *BRAF*-Gens mit einer aberranten DNA-Methylierung assoziiert ist (Tischoff und Tannapfel, 2013). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Bedeutung der Identifikation genetischer sowie epigenetischer Veränderungen, um besser auf das Verhalten des Tumors und das Therapieansprechen reagieren zu können. Weiterhin könnten diese Analysen den Weg ebnen, zirkulierende Tumorzellen bei Krebspatienten als effektive Möglichkeit zur Überwachung des Tumorgenoms während der Progression, der Therapie und bei einem Rezidiv zu nutzen. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob durch Mutationsanalysen von einzelnen Zellen Rückschlüsse auf das Tumorgeschehen gezogen werden können. Es besteht die Hoffnung, dass zukünftig durch eine nicht-invasiv gewonnene Blutprobe (*liquid biopsy*) der Nachweis sowie das Monitoring wichtiger molekularer Marker gelingt und die Tumorthherapie erfolgreich individuell auf den Patienten abgestimmt erfolgen kann.

Quellenverzeichnis

Aktas B, Tewes M, Fehm T, Hauch S, Kimmig R, Kasimir-Bauer S. Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2009;11(4):R46

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003 Apr 1;100(7):3983-8.

Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem.* 2013 Jan;59(1):110-8.

Amato RJ, Melnikova V, Zhang Y, Liu W, Saxena S, Shah PK, Jensen BT, Torres KE, Davis DW. Epithelial cell adhesion molecule-positive circulating tumor cells as predictive biomarker in patients with prostate cancer. *Urology.* 2013 Jun;81(6):1303-7.

Ameri K, Luong R, Zhang H, Powell AA, Montgomery KD, Espinosa I, Bouley DM, Harris AL, Jeffrey SS. Circulating tumour cells demonstrate an altered response to hypoxia and an aggressive phenotype. *Br J Cancer.* 2010 Feb 2;102(3):561-9.

Arnold C. *Kolorektales Karzinom – Prävention und Früherkennung.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Coloproctology* 2013;35:151-158.

Arruebo M, Fernandez-Pacheco R, Ibarra MR, Santamaria J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today.* 2007;2(3):22–32.

Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Australian Medical Journal.* 1869;14:146–7.

Ataseven B, Eiermann W, Molls M, Pigorsch S. *Strahlentherapie nach brusterhaltender Therapie.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Gynäkologe* 2010;43:989-995.

Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Konishi H, Karakas B, Blair BG, Lin C, Peters BA, Velculescu VE, Park BH. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther.* 2004 Aug;3(8):772-5.

Balzer EM, Whipple RA, Cho EH, Matrone MA, Martin SS. Antimitotic chemotherapeutics promote adhesive responses in detached and circulating tumor cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 May;121(1):65-78.

Bates SE, Amiri-Kordestani L, Giaccone G. Drug development: portals of discovery. *Clin Cancer Res.* 2012 Jan 1;18(1):23-32.

Berger DB, Engelhardt R, Mertelsmann R. *Das rote Buch – Hämatologie und Internistische Onkologie.* 4. Auflage. ecomed MEDIZIN 2010.

Berger T. Identifikation und molekulare Charakterisierung von zirkulierenden Tumorzellen beim hepatozellulären Karzinom [naturw. Masterarbeit, 2013]. Jena: Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena.

Berruti A, Generali D, Kaufmann M, Puztai L, Curigliano G, Aglietta M, Gianni L, Miller WR, Untch M, Sotiriou C, Daidone M, Conte P, Kennedy D, Damia G, Petronini P, Di

- Cosimo S, Bruzzi P, Dowsett M, Desmedt C, Mansel RE, Olivetti L, Tondini C, Sapino A, Fenaroli P, Tortora G, Thorne H, Bertolini F, Ferrozzi F, Danova M, Tagliabue E, de Azambuja E, Makris A, Tampellini M, Dontu G, Van't Veer L, Harris AL, Fox SB, Dogliotti L, Bottini A. International expert consensus on primary systemic therapy in the management of early breast cancer: highlights of the Fourth Symposium on Primary Systemic Therapy in the Management of Operable Breast Cancer, Cremona, Italy (2010). *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2011;2011(43):147-51.
- Biagi JJ, Raphael MJ, Mackillop WJ, Kong W, King WD, Booth CM. Association between time to initiation of adjuvant chemotherapy and survival in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 2011 Jun 8;305(22):2335-42.
- Boughdady IS, Kinsella AR, Haboubi NY, Schofield PF. K-ras gene mutations in adenomas and carcinomas of the colon. *Surg Oncol.* 1992 Aug;1(4):275-82.
- Camara O, Rengsberger M, Egbe A, Koch A, Gajda M, Hammer U, Jörke C, Rabenstein C, Untch M, Pachmann K. The relevance of circulating epithelial tumor cells (CETC) for therapy monitoring during neoadjuvant (primary systemic) chemotherapy in breast cancer. *Ann Oncol.* 2007 Sep;18(9):1484-92.
- Castaneda CA, Cortes-Funes H, Gomez HL, Ciruelos EM. The phosphatidyl inositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2010 Dec;29(4):751-9.
- Clement JH, Schwalbe M, Buske N, Wagner K, Schnabelrauch M, Görnert P, Kliche KO, Pachmann K, Weitschies W, Höffken K. Differential interaction of magnetic nanoparticles with tumor cells and peripheral blood cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006 May;132(5):287-92. Epub 2006 Jan 24.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002 Aug;2(8):563-72.
- Christofori G. New signals from the invasive front. *Nature.* 2006 May 25;441(7092):444-50.
- Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 2003 Mar 6;422(6927):37-44.
- Cowell CF, Weigelt B, Sakr RA, Ng CK, Hicks J, King TA, Reis-Filho JS. Progression from ductal carcinoma in situ to invasive breast cancer: revisited. *Mol Oncol.* 2013 Oct;7(5):859-69.
- Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2004 Aug 19;351(8):781-91.
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004 Jul 22;351(4):337-45.
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A,

- Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949-54.
- De Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, Parker C, Miller MC, Tissing H, Doyle GV, Terstappen LW, Pienta KJ, Raghavan D. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008 Oct 1;14(19):6302-9.
- de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4(10):769-80.
- Diehn M, Clarke MF. Cancer stem cells and radiotherapy: new insights into tumor radioresistance. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Dec 20;98(24):1755-7.
- Dietel M, Baretton G, Gabbert HE, Jung A, Kloor M, Liffers ST, Kreipe H, Schäfer KL, Schirmacher P, Sers C, Schlake W, Kirchner T. Erweiterter *RAS*-Mutationsstatus - Neue Erfordernisse bei der molekularpathologischen Analyse des metastasierten kolorektalen Karzinoms. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Onkologe* 2014;20:492-496.
- Ditsch N, Kahler S, Lenhard M, Kümper C, Bauerfeind I, Untch M. Immunologische Therapie beim Mammakarzinom. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Onkologe* 2006;12:945-954.
- Dumont AG, Dumont SN, Trent JC. The favorable impact of PIK3CA mutations on survival: an analysis of 2587 patients with breast cancer. *Chin J Cancer*. 2012 Jul;31(7):327-34.
- Eucker J, Emde A, Possinger K. Therapie des Mammakarzinoms: Vom Hormon bis zum Antikörper. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Internist* 2006;47(12):1223-4, 1226-8.
- Fabbri F, Carloni S, Zoli W, Ulivi P, Gallerani G, Fici P, Chiadini E, Passardi A, Frassinetti GL, Ragazzini A, Amadori D. Detection and recovery of circulating colon cancer cells using a dielectrophoresis-based device: KRAS mutation status in pure CTCs. *Cancer Lett*. 2013 Jul 10;335(1):225-31.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759-67.
- Fehm T, Banys M, Meier-Stiegen F, Hartkopf A, Müller V. Klinische Relevanz zirkulierender Mammakarzinomzellen. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Gynäkologe* 2012;45:563-567.
- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):453-8.
- Finkelstein SD, Sayegh R, Christensen S, Swalsky PA. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behavior correlates with K-ras-2 mutation type. *Cancer*. 1993 Jun 15;71(12):3827-38.
- Friedl P, Alexander S. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell*. 2011 Nov 23;147(5):992-1009.
- Fulda S. Regulation of apoptosis pathways in cancer stem cells. *Cancer Lett*. 2013 Sep 10;338(1):168-73.
- Gasch C, Bauernhofer T, Pichler M, Langer-Freitag S, Reeh M, Seifert AM, Mauermann O, Izbicki JR, Pantel K, Riethdorf S. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor status

- and mutations of KRAS/PIK3CA in circulating tumor cells of patients with colorectal cancer. *Clin Chem*. 2013 Jan;59(1):252-60.
- Gasent Blesa JM, Alberola Candel V, Esteban González E, Vidal Martínez J, Gisbert Criado R, Provencio Pulla M, Laforga Canales J, Pachmann K. Circulating tumor cells in breast cancer: methodology and clinical repercussions. *Clin Transl Oncol*. 2008 Jul;10(7):399-406.
- Goldenring JR. A central role for vesicle trafficking in epithelial neoplasia: intracellular highways to carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2013 Nov;13(11):813-20.
- Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*. 2013 Sep;24(9):2206-23.
- Gorges TM, Pantel K. Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2013 May;62(5):931-9.
- Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Röse L, Zollner TM, Krahn T, von Ahsen O. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*. 2012 May 16;12:178.
- Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. 2001 Aug 3;293(5531):876-80.
- Harbeck N, Possinger K, Thomssen C. Aktuelle Veränderungen der S3-Leitlinie Mammakarzinom. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Gynäkologe* 2012;45:443-447.
- Harbeck N, Sotlar K. Tripelnegatives Mammakarzinom. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Best practice onkologie* 2014;1(9):6-10.
- Harouaka R, Kang Z, Zheng SY, Cao L. Circulating tumor cells: advances in isolation and analysis, and challenges for clinical applications. *Pharmacol Ther*. 2014 Feb;141(2):209-21.
- Hartmann K, Becker-Putsche M, Bocklitz T, Pachmann K, Niendorf A, Rösch P, Popp J. A study of Docetaxel-induced effects in MCF-7 cells by means of Raman microspectroscopy. *Anal Bioanal Chem*. 2012 May;403(3):745-53.
- Harush-Frenkel O, Debotton N, Benita S, Altschuler Y. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Feb 2;353(1):26-32.
- Hayes DF, Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Miller MC, Matera J, Allard WJ, Doyle GV, Terstappen LW. Circulating tumor cells at each follow-up time point during therapy of metastatic breast cancer patients predict progression-free and overall survival. *Clin Cancer Res*. 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4218-24.
- Heitzer E, Auer M, Gasch C, Pichler M, Ulz P, Hoffmann EM, Lax S, Waldispuehl-Geigl J, Mauermann O, Lackner C, Höfler G, Eisner F, Sill H, Samonigg H, Pantel K, Riethdorf S, Bauernhofer T, Geigl JB, Speicher MR. Complex tumor genomes inferred from single circulating tumor cells by array-CGH and next-generation sequencing. *Cancer Res*. 2013 May 15;73(10):2965-75.

- Hekimian K. Änderung der EpCAM-Expression in zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut während des Krankheitsverlaufs [naturw. Dissertation, 2012]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Hochhaus A, Lin F, Reiter A, Skladny H, Hehlmann R, Goldman JM, Cross NC. Monitoring the efficiency of interferon-alpha therapy in chronic myelogenous leukemia (CML) patients by competitive polymerase chain reaction. *Leukemia*. 1997 Apr;11 Suppl 3:541-4.
- Hrkach J, Von Hoff D, Mukkaram Ali M, Andrianova E, Auer J, Campbell T, De Witt D, Figa M, Figueiredo M, Horhota A, Low S, McDonnell K, Peeke E, Retnarajan B, Sabnis A, Schnipper E, Song JJ, Song YH, Summa J, Tompsett D, Troiano G, Van Geen Hoven T, Wright J, LoRusso P, Kantoff PW, Bander NH, Sweeney C, Farokhzad OC, Langer R, Zale S. Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile. *Sci Transl Med*. 2012 Apr 4;4(128):128ra39.
- Janku F, Lee JJ, Tsimberidou AM, Hong DS, Naing A, Falchook GS, Fu S, Luthra R, Garrido-Laguna I, Kurzrock R. PIK3CA mutations frequently coexist with RAS and BRAF mutations in patients with advanced cancers. *PLoS One*. 2011;6(7):e22769.
- Jäger B, Schochter F, Scholz C, Janni W. Zirkulierende Tumorzellen beim Mammakarzinom; Klinische Konsequenzen. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Gynäkologe* 2013;46:382-385.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
- Josse SA, Pantel K. Biologic challenges in the detection of circulating tumor cells. *Cancer Res*. 2013 Jan 1;73(1):8-11.
- Kallinowski F und Schmidt J. Das Kolonkarzinom. Empfehlungen für eine standardisierte Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 1999. <http://www.dkfz-heidelberg.de>
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1420-8.
- Kath R, Höffken K. Mechanismen der Metastasierung und deren Beeinflussung. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Onkologie* 1998;4:560-565.
- Kaufmann M, Loibl S, Solbach C. Brustkrebs – Bescheid wissen, Entscheiden und Leben. 1. Auflage. Wort & Bild Verlag. Baierbrunn, 2002.
- Kienle P, Koch M, Autschbach F, Benner A, Treiber M, Wannenmacher M, von Knebel Doeberitz M, Büchler M, Herfarth C, Weitz J. Decreased detection rate of disseminated tumor cells of rectal cancer patients after preoperative chemoradiation: a first step towards a molecular surrogate marker for neoadjuvant treatment in colorectal cancer. *Ann Surg*. 2003 Sep;238(3):324-331.
- King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science*. 1985 Sep 6;229(4717):974-6.
- Koch M, Kienle P, Hinz U, Antolovic D, Schmidt J, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M, Weitz J. Detection of hematogenous tumor cell dissemination predicts tumor relapse in patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg*. 2005 Feb;241(2):199-205.

- Königsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, de Santis M, Zeillinger R, Hudec M, Dittrich C. Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients. *Acta Oncol.* 2011 Jun;50(5):700-10.
- Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Robert-Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2013.
- Kunzmann A, Andersson B, Thurnherr T, Krug H, Scheynius A, Fadeel B. Toxicology of engineered nanomaterials: focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Mar;1810(3):361-73.
- Kuznetsov AV, Margreiter R, Amberger A, Saks V, Grimm M. Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Jun;1813(6):1144-52.
- Leiner P. Gentest vor Darmkrebstherapie fast schon die Regel. *Ärzte Zeitung online*, 2011.
- Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V.. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms. Langversion 3.0. Berlin, 2012.
- Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutsche Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V.. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Kurzversion 1.0. Berlin. 2013.
- Li J, Yang L, Gaur S, Zhang K, Wu X, Yuan YC, Li H, Hu S, Weng Y, Yen Y. Mutants TP53 p.R273H and p.R273C but not p.R273G Enhance Cancer Cell Malignancy. *Hum Mutat.* 2014 May;35(5):575-84.
- Lin HC, Hsu HC, Hsieh CH, Wang HM, Huang CY, Wu MH, Tseng CP. A negative selection system PowerMag for effective leukocyte depletion and enhanced detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells. *Clin Chim Acta.* 2013 Apr 18;419:77-84.
- Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2003 Mar 6;348(10):919-32.
- Mallon E, Osin P, Nasiri N, Blain I, Howard B, Gusterson B. The basic pathology of human breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2000 Apr;5(2):139-63.
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008 May 16;133(4):704-15.
- Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature.* 2013 Sep 19;501(7467):328-37.
- Mikolajczyk SD, Millar LS, Tsinberg P, Coutts SM, Zomorodi M, Pham T, Bischoff FZ, Pircher TJ. Detection of EpCAM-Negative and Cytokeratin-Negative Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood.. *J Oncol.* 2011;2011:252361.
- „MiNa-CTC“ – Erarbeitung eines mobilen mikrosystemtechnischen Gesamtsystems für Anreicherung, Nachweis und Charakterisierung zirkulierender Tumorzellen. Gefördert durch das BMBF (FKZ 16SV5431); Laufzeit: 01.01.2011 - 31.06.2014.

- Miranda E, Bianchi P, Destro A, Morengi E, Malesci A, Santoro A, Laghi L, Roncalli M. Genetic and epigenetic alterations in primary colorectal cancers and related lymph node and liver metastases. *Cancer*. 2013 Jan 15;119(2):266-76.
- Mitchell MJ, King MR. Physical biology in cancer. 3. The role of cell glycocalyx in vascular transport of circulating tumor cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014 Jan 15;306(2):C89-97.
- Mostert B, Jiang Y, Sieuwerts AM, Wang H, Bolt-de Vries J, Biermann K, Kraan J, Lalmahomed Z, van Galen A, de Weerd V, van der Spoel P, Ramírez-Moreno R, Verhoef C, Ijzermans JN, Wang Y, Gratama JW, Foekens JA, Sleijfer S, Martens JW. KRAS and BRAF mutation status in circulating colorectal tumor cells and their correlation with primary and metastatic tumor tissue. *Int J Cancer*. 2013 Jul;133(1):130-41.
- Müller B. Charakterisierung der Leukozytensubpopulationen nach magnetischer Tumorzelldepletion [med. Dissertation, 2011]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Nicolini A, Ferrari P, Fini M, Borsari V, Fallahi P, Antonelli A, Berti P, Carpi A, Miccoli P. Stem Cells: Their Role in Breast Cancer Development and Resistance to Treatment. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011 Feb 1;12(2):196-205.
- Osborne CK, Hobbs K, Trent JM. Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories. *Breast Cancer Res Treat*. 1987;9(2):111-21.
- Pachmann K, Clement JH, Schneider CP, Willen B, Camara O, Pachmann U, Höffken K. Standardized quantification of circulating peripheral tumor cells from lung and breast cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2005b;43(6):617-27.
- Pachmann K, Heiss P, Demel U, Tilz G. Detection and quantification of small numbers of circulating tumour cells in peripheral blood using laser scanning cytometer (LSC®). *Clin Chem Lab Med*. 2001;39(9):811-7.
- Pachmann K. Longtime recirculating tumor cells in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2005a;11(15):5657.
- Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989 Aug;8(2):98-101.
- Pantel K, Alix-Panabières C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction? *Cancer Res*. 2013 Nov 1;73(21):6384-8.
- Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jun;4(6):448-56.
- Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(5):329-340.
- Pantel K, Denève E, Nocca D, Coffy A, Vendrell JP, Maudelonde T, Riethdorf S, Alix-Panabières C. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin Chem*. 2012 May;58(5):936-40.
- Pantel K, Müller V, Auer M, Nusser N, Harbeck N, Braun S. Detection and clinical implications of early systemic tumor cell dissemination in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2003 Dec;9(17):6326-34.

- Pantel K, von Knebel Doeberitz M, Izbicki JR, Riethmüller G. Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance, phenotyping and therapeutic strategies. *Chirurg.* 1997;68(12):1241-1250.
- Panteleakou Z, Lembessis P, Sourla A, Pissimissis N, Polyzos A, Deliveliotis C, Koutsilieris M. Detection of circulating tumor cells in prostate cancer patients: methodological pitfalls and clinical relevance. *Mol Med.* 2009 Mar-Apr;15(3-4):101-14.
- Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet.* 2011 Nov;52(4):413-35.
- Parkinson DR, Dracopoli N, Petty BG, Compton C, Cristofanilli M, Deisseroth A, Hayes DF, Kapke G, Kumar P, Lee JSh, Liu MC, McCormack R, Mikulski S, Nagahara L, Pantel K, Pearson-White S, Punnoose EA, Roadcap LT, Schade AE, Scher HI, Sigman CC, Kelloff GJ. Considerations in the development of circulating tumor cell technology for clinical use. *J Transl Med.* 2012 Jul 2;10:138.
- Pfützner C, Schröder I, Scheungraber C, Dogan A, Runnebaum IB, Dürst M, Häfner N. Digital-Direct-RT-PCR: a sensitive and specific method for quantification of CTC in patients with cervical carcinoma. *Sci Rep.* 2014 Feb 5;4:3970.
- Rack BK, Schindlbeck C, Andergassen U, Schneeweiss A, Zwingers T, Lichtenegger W, Beckmann M, Sommer HL, Pantel K, Janni W. Use of circulating tumor cells (CTC) in peripheral blood of breast cancer patients before and after adjuvant chemotherapy to predict risk for relapse: The SUCCESS trial. *J Clin Oncol.* 2010;28:Abstract 1003.
- Rao CG, Chianese D, Doyle GV, Miller MC, Russell T, Sanders RA Jr, Terstappen LW. Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. *Int J Oncol.* 2005 Jul;27(1):49-57.
- Roa I, Sánchez T, Majlis A, Schalper K. KRAS gene mutation in colorectal cancer. *Rev Med Chil.* 2013 Sep;141(9):1166-72.
- Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev.* 2007 Oct 15;21(20):2525-38.
- Sancho E, Batlle E, Clevers H. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:695-723.
- Sayer HG, Jänicke F, Budach W, Höffken K. Therapie des metastasierten Mammakarzioms. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Onkologe* 2008;14:514-519.
- Scharl A, Salterberg A. Multimodale Therapie des nicht metastasierten Mammakarzinoms. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Onkologe* 2014;4:379-391.
- Schmid P, Possinger K. Adjuvante und neoadjuvante systemische Therapie des Mammakarzinoms. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Internist* 2002;43:341-353.
- Schulze K, Gasch C, Staufer K, Nashan B, Lohse AW, Pantel K, Riethdorf S, Wege H. Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2013 Nov;133(9):2165-71.
- Schwalbe M., Jörke C., Buske N., Höffken K., Pachmann K. und Clement, J.H. 2005. Selective reduction of the interaction of magnetic nanoparticles with leukocytes and tumor cells by human plasma. *J Magn Magn Mater.* 2005;293:433-437.

- Schwalbe M, Buske N, Vetterlein M, Höffken K, Pachmann K, Clement JH. The carboxymethyl dextran shell is an important modulator of magnetic nanoparticle uptake in human cells. *Z Phys Chem*. 2006a;220:125-131.
- Schwalbe M, Pachmann K, Höffken K, Clement JH. Improvement of the separation of tumor cells from peripheral blood cells using magnetic nanoparticles. *J Phys Condens Mat*. 2006b;18:2865-2876.
- Shigdar S, Li Y, Bhattacharya S, O'Connor M, Pu C, Lin J, Wang T, Xiang D, Kong L, Wei MQ, Zhu Y, Zhou S, Duan W. Inflammation and cancer stem cells. *Cancer Lett*. 2014 Apr 10;345(2):271-8.
- Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt-de Vries J, van der Spoel P, Mostert B, Martens JW, Gratama JW, Sleijfer S, Foekens JA. Molecular characterization of circulating tumor cells in large quantities of contaminating leukocytes by a multiplex real-time PCR. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Dec;118(3):455-68.
- Simi L, Pratesi N, Vignoli M, Sestini R, Cianchi F, Valanzano R, Nobili S, Mini E, Pazzagli M, Orlando C. High-resolution melting analysis for rapid detection of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutations in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*. 2008 Aug;130(2):247-53.
- Singh N, Jenkins GJ, Asadi R, Doak SH. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Rev*. 2010;1.
- Slade MJ, Payne R, Riethdorf S, Ward B, Zaidi SA, Stebbing J, Palmieri C, Sinnott HD, Kulinskaya E, Pitfield T, McCormack RT, Pantel K, Coombes RC. Comparison of bone marrow, disseminated tumour cells and blood-circulating tumour cells in breast cancer patients after primary treatment. *Br J Cancer*. 2009 Jan 13;100(1):160-6.
- Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M, Pinter T, Valero V, Liu MC, Sauter G, von Minckwitz G, Visco F, Bee V, Buyse M, Bendahmane B, Tabah-Fisch I, Lindsay MA, Riva A, Crown J. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2011 Oct 6;365(14):1273-83.
- Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*. 2006 Aug;12(8):895-904.
- Stintzing S, Heinemann V, Jung, A, Moosmann N, Hiddemann W, Kirchner T. Behandlung des kolorektalen Karzinoms mit monoklonalen Antikörpern. *Dtsch Arztebl*. März 2009; 106(12):202-6.
- Strauss A, Janni W, Maass N. *Klinikmanual Gynäkologie und Geburtshilfe*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Gynäkologie und Geburtshilfe 2009;12:60.
- Thalgott M, Heck MM, Pantel K. Detektion zirkulierender Tumorzellen im peripheren Blut beim Prostatakarzinom. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Urologe* 2014;53:509-513.
- Thalgott M, Rack B, Maurer T, Souvatzoglou M, Eiber M, Kreß V, Heck MM, Andergassen U, Nawroth R, Gschwend JE, Retz M. Detection of circulating tumor cells in different stages of prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 May;139(5):755-63.
- Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jun;2(6):442-54.
- Thomas RK, Baker AC, DeBiasi RM, Winckler W, Laframboise T, Lin WM, Wang M, Feng W, Zander T, MacConaill L, Lee JC, Nicoletti R, Hatton C, Goyette M, Girard L, Majumdar

- K, Ziaugra L, Wong KK, Gabriel S, Beroukhir R, Peyton M, Barretina J, Dutt A, Emery C, Greulich H, Shah K, Sasaki H, Gazdar A, Minna J, Armstrong SA, Mellinghoff IK, Hodi FS, Dranoff G, Mischel PS, Cloughesy TF, Nelson SF, Liao LM, Mertz K, Rubin MA, Moch H, Loda M, Catalona W, Fletcher J, Signoretti S, Kaye F, Anderson KC, Demetri GD, Dummer R, Wagner S, Herlyn M, Sellers WR, Meyerson M, Garraway LA. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat Genet.* 2007 Mar;39(3):347-51.
- Tinhofer I, Hristozova T, Stromberger C, Keilhoiz U, Budach V. Monitoring of circulating tumor cells and their expression of EGFR/phospho-EGFR during combined radiotherapy regimens in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012 Aug 1;83(5):e685-90.
- Tischoff I, Tannapfel A. Präkanzerose im Kolon. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. *Internist* 2013;54(6):691-698.
- Treuel L, Jiang X, Nienhaus GU. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *J R Soc Interface.* 2013 Feb 20;10(82):20120939.
- Van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002 Jan 31;415(6871):530-6.
- Van't Veer LJ, Weigelt B. Road map to metastasis. *Nat Med.* 2003 Aug;9(8):999-1000.
- Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small.* 2010 Jan;6(1):12-21.
- Villanueva A, Cañete M, Roca AG, Calero M, Veintemillas-Verdaguer S, Serna CJ, Morales Mdel P, Miranda R. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology.* 2009 Mar 18;20(11):115103.
- Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 1993 Apr;9(4):138-41.
- Wagner K, Kautz A, Röder M, Schwalbe M, Pachmann K, Clement JH, Schnabelrauch M. Synthesis of oligonucleotide-functionalized magnetic nanoparticles and study on their *in vitro* cell uptake. *Appl. Organomet. Chem.* 2004;18:514-519.
- Wang Q, Zhong M, Lü YL, Yuan J, Wei LX. Correlation of KRAS gene mutations and clinicopathologic parameters in colorectal carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 2012 Sep;41(9):603-6.
- Weinberg RA. *The Biology of Cancer.* New York Abingdon: Garland Science, Taylor & Francis Group. 2007, 591.
- Weiss L. Metastatic inefficiency. *Adv Cancer Res.* 1990;54:159-211.
- Wotschadlo J. Interaktion von Polysaccharid-basierten Nanopartikeln mit humanen Zellen [naturw. Dissertation, 2013]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Wotschadlo J, Liebert T, Heinze T, Wagner K, Schnabelrauch M, Dutz S, Müller R, Steiniger F, Schwalbe M, Kroll T, Höffken K, Buske N, Clement JH. Magnetic nanoparticles coated with tailored polysaccharide-based shells – Interaction with human cells. *J Magn Magn Mater.* 2009;321:1469-1473.

- Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Baba M, Nio K, Hara Y, Zeng SS, Hayashi T, Kondo M, Takatori H, Yamashita T, Mizukoshi E, Ikeda H, Zen Y, Takamura H, Wang XW, Kaneko S. Discrete nature of EpCAM+ and CD90+ cancer stem cells in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013 Apr;57(4):1484-97.
- Yan T, Yin W, Zhou Q, Zhou L, Jiang Y, Du Y, Shao Z, Lu J. The efficacy of zoledronic acid in breast cancer adjuvant therapy: a meta-analysis of randomised controlled trials. *Eur J Cancer*. 2012 Jan;48(2):187-95.
- Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*. 2008;14(6):818–26.
- Yin W, Jiang Y, Shen Z, Shao Z, Lu J. Trastuzumab in the adjuvant treatment of HER2-positive early breast cancer patients: a meta-analysis of published randomized controlled trials. *PLoS One*. 2011;6(6):e21030.
- Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, Isakoff SJ, Ciciliano JC, Wells MN, Shah AM, Concannon KF, Donaldson MC, Sequist LV, Brachtel E, Sgroi D, Baselga J, Ramaswamy S, Toner M, Haber DA, Maheswaran S. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*. 2013 Feb 1;339(6119):580-4.
- Zhang L, Riethdorf S, Wu G, Wang T, Yang K, Peng G, Liu J, Pantel K. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2012 Oct 15;18(20):5701-10.
- Zhao S, Yang H, Zhang M, Zhang D, Liu Y, Liu Y, Song Y, Zhang X, Li H, Ma W, Zhang Q. Circulating tumor cells (CTCs) detected by triple-marker EpCAM, CK19, and hMAM RT-PCR and their relation to clinical outcome in metastatic breast cancer patients. *Cell Biochem Biophys*. 2013 Mar;65(2):263-73.
- Zhao W, Liu S, Cai M, Xu H, Jiang J, Wang H. Detection of carbohydrates on the surface of cancer and normal cells by topography and recognition imaging. *Chem Commun (Camb)*. 2013 Apr 14;49(29):2980-2.
- Zhe X, Cher ML, Bonfil RD. Circulating tumor cells: finding the needle in the haystack. *Am J Cancer Res*. 2011;1(6):740-51.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Die Adenom-Karzinom-Sequenz.	8
Abb. 2 Schematische Darstellung der Fernmetastasierung von soliden Tumoren.	11
Abb. 3 Die Beteiligung von EMT und MET bei der Metastasierung.	14
Abb. 4 Einfluss einer <i>KRAS</i> -Mutation auf die EGFR-abhängige Signaltransduktion.	17
Abb. 5 Anwendungsmöglichkeiten magnetischer Nanopartikel in der Medizin.	18
Abb. 6 Magnetisches Separations (MACS)-System.	26
Abb. 7 Mikroskopischer Nachweis epithelialer Zellen mittels LSC (40x).	27
Abb. 8 Der Zellmanipulator AVISO-CellCelector (ALS).	30
Abb. 9 Darstellung durchflusszytometrischer Untersuchungen verschiedener Nanopartikelumhüllungen auf das Interaktionsverhalten von humanen Zellen aus der Vollblutprobe eines Karzinompatienten.	39
Abb. 10 MACS-Separation humaner Zellen aus der Vollblutprobe eines Karzinompatienten mit unterschiedlich umhüllten Nanopartikeln ($n = 1$, am Patientenpool).	41
Abb. 11 MACS-Separation humaner Zellen aus der Vollblutprobe eines Karzinompatienten mit unterschiedlich umhüllten Nanopartikeln ($n = 6$).	42
Abb. 12 Untersuchung unterschiedlicher Inkubationszeiten der Nanopartikel auf das Aufnahmeverhalten von humanen Zellen ($n=2$).	44
Abb. 13 Untersuchung verschiedener Plasmakonzentrationen auf das Aufnahmeverhalten von humanen Zellen ($n=6$).	46
Abb. 14 Untersuchung verschiedener Plasmakonzentrationen auf das Aufnahmeverhalten von humanen Zellen ($n=6$).	48
Abb. 15 Versuchsprotokoll zur Untersuchung des therapieabhängigen Anreicherungseffektes tumorverdächtiger Zellen und anschließenden Analysenverfahren.	50
Abb. 16 Mikroskopische Aufnahmen (40x) zur Darstellung des Anreicherungseffektes EpCAM ⁺ tumorverdächtiger Zellen nach der MACS-Separation.	51
Abb. 17 FACS-Analysen zur Darstellung des Anreicherungseffektes tumorverdächtiger Zellen nach der MACS-Separation.	52
Abb. 18 MACS-Separation an Vollblutproben von Mammakarzinompatienten ($n=390$).	53
Abb. 19 Prozentuale Anteile EpCAM ⁺ tumorverdächtiger Zellen der einzelnen Patientenproben in der Positivfraktion ($n=390$).	54
Abb. 20 Therapieabhängige Anreicherung der tumorverdächtigen Zellen in der separierten Positivfraktion.	55
Abb. 21 Darstellung des prozentualen Anteils tumorverdächtiger Zellen vor sowie nach der MACS-Separation von Patienten in verschiedenen Therapiezuständen.	57
Abb. 22 Verteilung der Zelltypen in der Positivfraktion nach der MACS-Separation von Patientenproben während unterschiedlicher Zytostatikabehandlungen.	60

Abb. 23 Darstellung des prozentualen Anteils tumorverdächtiger Zellen vor sowie nach der MACS-Separation von Patienten während der Behandlung mit verschiedenen Formen der Chemotherapie.	61
Abb. 24 Bestimmung der Zellzahl pro ml Vollblut sowie die prozentuale Verteilung der Zellen in den separierten Fraktionen nach der MACS-Separation von Patienten vor, während und nach Chemotherapie.	63
Abb. 25 Verteilung der Zelltypen in der Positivfraktion nach der MACS-Separation von Patienten vor, während und nach Chemotherapie.	64
Abb. 26 Darstellung des prozentualen Anteils tumorverdächtiger Zellen vor sowie nach der MACS-Separation von Patienten im Verlaufe einer Chemotherapie.	65
Abb. 27 Vitalität der tumorverdächtigen Zellen in den einzelnen Fraktionen vergleichend von Patienten vor, während und nach Chemotherapie.	66
Abb. 28 Beobachtung von tumorverdächtigen Zellen pro ml Blut und deren Wechselwirkung mit magnetischen Nanopartikeln am Beispiel einer Mammakarzinompatientin im Verlauf einer Chemotherapie.	68
Abb. 29 Verteilung der Zelltypen in der Positivfraktion nach der MACS-Separation einer Patientenprobe nach der Inkubation mit Cyclophosphamid (n = 1, am Patientenpool).	70
Abb. 30 Untersuchung des Einflusses von Cyclophosphamid auf das Interaktionsverhalten von humanen RPMI-8226 Zellen zu magnetischen Nanopartikeln nach 4-tägiger Inkubation (n = 1).	71
Abb. 31 Darstellung der nested PCR-Produkte des <i>BRAF</i> -Gens auf einem 3 %-igem Agarosegel.	75
Abb. 32 Darstellung der ermittelten Mutationsraten des untersuchten <i>KRAS</i> -Gens von Einzelzellen im Vergleich zum Zellverband.	76
Abb. 33 Darstellung der ermittelten Mutationsraten des untersuchten <i>BRAF</i> -Gens von Einzelzellen im Vergleich zum Zellverband.	78
Abb. 34 Darstellung der ermittelten Mutationsraten des untersuchten <i>PIK3CA</i> -Gens von Einzelzellen im Vergleich zum Zellverband.	79
Abb. 35 Versuchsprotokoll zur Untersuchung des Mutationsstatus tumorverdächtiger Zellen bei Patienten mit <i>KRAS</i> -mutiertem Primärtumor.	81
Abb. 36 Untersuchung der Nanopartikelinkubation auf das Aufnahmeverhalten der tumorverdächtigen Zellen des <i>KRAS</i> -mutierten Kolonkarzinompatienten.	83
Abb. 37 Mikroskopische Aufnahmen der tumorverdächtigen EpCAM ⁺ Zellen in der angereicherten Fraktion und deren erfolgreiche Isolation mit Hilfe des AVISO-CellCelector.	84
Abb. 38 Mutationsstatus der isolierten Einzelzelle sc59.	85
Abb. 39 Darstellung der Ergebnisse der Mutationsanalysen mittels Pyrosequenzierung.	86

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Die wichtigsten Medikamente beim Mammakarzinom (modifiziert nach Kaufmann et al., 2002).....	6
Tab. 2 Verwendete humane Zelllinien und deren Kultivierung	25
Tab. 3 Protokoll zur Bestimmung der zirkulierenden tumorverdächtigen Zellen aus Vollblutproben von Patienten.....	28
Tab. 4 Protokoll zur Bestimmung der zirkulierenden tumorverdächtigen Zellen aus Vollblutproben von Patienten.....	28
Tab. 5 Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome.	29
Tab. 6 Untersuchte Gene.....	31
Tab. 7 Verwendete Primer für die Einzelzell-PCR.	32
Tab. 8 PCR-Reaktionsansatz für Einzelzellen und die DNA aus dem Zellverband.	32
Tab. 9 Amplifikationsprogramm für die PCR-Reaktion.....	33
Tab. 10 Primerspezifische Annealing-Temperaturen und Amplifikationszyklen für die PCR-Reaktion.	33
Tab. 11 Reaktionsansatz für die vorbereitende PCR zur Sanger-Sequenzierung.	35
Tab. 12 Amplifikationsprogramm für die vorbereitende PCR zur Sanger-Sequenzierung.	35
Tab. 13 Verwendete Primer für die Pyrosequenzierung.	36
Tab. 14 Anreicherungsverhältnis und Anreicherungsfaktor nach unterschiedlichen Inkubationszeiten.	45
Tab. 15 Medianer therapieabhängiger Anreicherungsfaktor der tumorverdächtigen Zellen in der separierten Positivfraktion.	58
Tab. 16 Medianer Anreicherungsfaktor der tumorverdächtigen Zellen in der separierten Positivfraktion vor und nach der Strahlentherapie sowie am Patientenbeispiel.	59
Tab. 17 Medianer Anreicherungsfaktor der tumorverdächtigen Zellen in der separierten Positivfraktion von Patienten während unterschiedlicher Chemotherapieformen.	62
Tab. 18 Medianer Anreicherungsfaktor der tumorverdächtigen Zellen in der separierten Positivfraktion von Patienten vor, während und nach Chemotherapie.	66
Tab. 19 Untersuchte mutierte Zelllinien und ihre Eigenschaften.....	74
Tab. 20 Zahl der isolierten Einzelzellen und die ermittelte Pickerfolgsrate.	75
Tab. 21 Vergleich der erhaltenen Mutationsrate der untersuchten Gene verschiedener Zellkulturen mit den in der Literatur beschriebenen Anteilen (Thomas et al., 2007).	80
Tab. 22 Klinische Daten zum <i>KRAS</i> -mutierten Kolonkarzinompatienten.....	82

Materialien

Blutauarbeitung

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Erythrozyten-lysepuffer	Ammoniumchlorid [15 mM] Kaliumhydrogencarbonat [10 mM] EDTA-Lösung [500 nM] Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland
D-PBS-EDTA	D-PBS EDTA [2 mM] Invitrogen™, Eggenstein, Deutschland Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland
Reagenzröhren konisch (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Megafuge 2.0 R	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Zellkultur

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
D-PBS	Invitrogen™, Eggenstein, Deutschland
Trypsin-EDTA	Invitrogen™, Eggenstein, Deutschland
DMEM (1x) (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Invitrogen™, Eggenstein, Deutschland
RPMI 1640 (1x) (Roswell Park Memorial Institute)	Invitrogen™, Eggenstein, Deutschland
FCS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Zellkulturflaschen Cellstar® (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner-Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Axiovert 25 mit AxioCAM HRC	ZEISS, Jena, Deutschland
Sterilwerkbank HERAsafe® HS 12/2	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
CO ₂ Inkubator HERAccl™ 240 i	Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge Rotofix 32	Hettich GmbH und Co. KG, Tuttlingen, Deutschland

Zellzahlbestimmung

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
D-PBS	Invitrogen™, Eggenstein, Deutschland
Isoton® II Diluent Beckman Coulter	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Messgefäße	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Coulter® Z2 particle count & size analyser	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

MACS-Zellseparation

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
D-PBS-EDTA	siehe Materialien Blutauarbeitung
Umhüllte Magnetnanopartikel	Kompetenzzentrum für Polysaccharid-forschung der Friedrich Schiller Universität Jena, Deutschland
MACS [®] Separation Columns (MS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Röhrchen (5 ml, 75x12 mm, PP)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
SuperMACS [™] II Separation Unit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

FluoreszenzmikroskopieLSC

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
D-PBS-EDTA	siehe Materialien Blutauarbeitung
Anti-EpCAM-FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-CD45-PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Polysine [™] Objekträger	MENZEL-GLÄSER, Braunschweig, Deutschland
LSC [™] , Mikroskop OLYMPUS BX50	Cytomation Inc., Fort Collins, CO, USA
Axioplan2 imaging, HBO 50, AxioCAM HRC	ZEISS, Jena, Deutschland

AVISO-CellCelector

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
D-PBS-EDTA	siehe Materialien Blutauarbeitung
Anti-EpCAM-AlexaFluor 488	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
PI (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland
Imaging Plate CG (96 well)	Zell-kontakt GmbH, Nörten-Hadenberg, Deutschland
AVISO-CellCelector	ALS, Jena, Deutschland

FACS

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
D-PBS-EDTA	siehe Materialien Blutauarbeitung
D-PBS	Invitrogen [™] , Eggenstein, Deutschland
FACS Flow [™] , FACS Clean, FACS Rinse	Becton, Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Anti-EpCAM-FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Anti-EpCAM-AlexaFluor 488	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Anti-CD45-PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Fortsetzung Materialien FACS:

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
PI (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland
Röhrchen (5 ml, 75x12 mm, PP)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
FACS-Calibur™	Becton, Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Einzelzellpräparation

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
D-PBS-EDTA	siehe Materialien Blutauarbeitung
D-PBS	Invitrogen™, Eggenstein, Deutschland
0,2 ml PCR-Gefäße	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Single Cell WGA Kit	New England Biolabs, Frankfurt a. M. , Deutschland
Glaskapillare (d=50 µm)	ALS, Jena, Deutschland
AVISO-CellCelector	ALS, Jena, Deutschland

NukleinsäureisolationExtraktion aus Einzelzellen

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
D-PBS	Invitrogen™, Eggenstein, Deutschland
Ampuwa® Wasser	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
0,2 ml PCR-Gefäße	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
0,1ml Strip Tubes and Caps	Qiagen, Hilden, Deutschland
Single Cell WGA Kit	New England Biolabs, Frankfurt a. M. , Deutschland
NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Deutschland
Centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Extraktion aus dem Zellverband

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
D-PBS	Invitrogen™, Eggenstein, Deutschland
Ampuwa® Wasser	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Single Cell WGA Kit	New England Biolabs, Frankfurt a. M. , Deutschland
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Deutschland

PCR

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Ampuwa® Wasser	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
dNTPs (2,5 mM)	New England Biolabs, Frankfurt a. M. , Deutschland
AmpliTa [®] Gold DNA Polymerase [5 U/μl] with GeneAmp 10x PCR Gold Buffer & MgCl ₂ [25 mM]	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Primer [20 μM]	siehe Methoden 3.7, Tab. 7
0,1ml Strip Tubes and Caps	Qiagen, Hilden, Deutschland
0,2 ml PCR-Gefäße	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
PCR plates (96 well)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cap Strips gewölbt	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR Verschlussfolie	Nerbe Plus GmbH, Winsen, Deutschland
Mastercycler [®]	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Fischer Scientific, Dreieich, Deutschland

Gelelektrophorese

Materialien			Hersteller
DNA-Ladungspuffer	Tris-HCl	10 mM pH 8,0	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland
	Na ₂ -EDTA	1 mM	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland
	SDS	15 mM	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland
	Glycerin	0,1 %	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland
	Bromphenolblau	30 %	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland
TAE-Laufpuffer [1x]	Tris-Acetat	40 mM	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
	Na ₂ -EDTA	1 mM, pH 8,5	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland
Agarose (Elektrophoresis Grade)			Invitrogen™, Eggenstein, Deutschland
Ethidiumbromid (10 mg/ml)			Invitrogen™, Eggenstein, Deutschland
100 bp DNA-ladder			Invitrogen™, Eggenstein, Deutschland
Agagel Maxi/Mini			Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Stromquelle™ Mighty Slim			Hoefer, Inc., Holliston, MA, USA
Gel Jet Imager			Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland

SequenzierungSanger-Sequenzierung

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
Anode Buffer Container 3500 Series	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Cathode Buffer Container 3500 Series	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Conditioning Reagent 3500 Series	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
POP6 (384) performance optimized polymer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Hi-Di Formamide	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Sequencing Standard v1.1	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Big Dye Terminator (BDT) v1.1 cycle seq. kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
96 well optical reaction plate with barcode	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Septa Cathode Buffer Container 3500 Series	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Septa (96 well)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Exonuclease I	New England Biolabs, Frankfurt a. M. , Deutschland
rapid Alkaline Phosphatase (1x)	Roche, Mannheim, Deutschland
Primer [10 µM]	siehe Methoden 3.7, Tab. 7
ABI3500 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Pyrosequenzierung

<i>Materialien</i>	<i>Hersteller</i>
PyroMark Wash Buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Binding Buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Gold Q96 Reagents	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Q96 Plate Low	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe	Qiagen, Hilden, Deutschland
Streptavidin Sepharose High Performance	GE Healthcare, Solingen, Deutschland
PyroMark Q96 Cartridge	Qiagen, Hilden, Deutschland
Primer [10 µM]	siehe Methoden 3.10.2, Tab. 13
PyroMark Q96 ID	Qiagen, Hilden, Deutschland

Anhang

Anlagenverzeichnis

A-1 Klinische Daten der verwendeter Patienten **XXI**

A-2 Auflistung der p-Werte und Standardabweichungen **XXXVI**

A-3 Lebenslauf **XLIII**

A-4 Veröffentlichungen **XLIV**

A-5 Ehrenwörtliche Erklärung **XLVI**

A-6 Danksagung **XLVII**

A-1 Klinische Daten der verwendeter Patienten

*Auflistung der klinischen Daten der verwendeten Mammakarzinompatientinnen
(siehe Kap. 4.1.2)*

<i>Patientin</i>		<i>Charakteristika des Mammakarzinoms</i>				<i>Anzahl der EDTA- Blutproben</i>
#	Alter	Histologie	ED	Metastasen	Rezidiv	
M-1	68	Invasives duktales Karzinom (bds)	12/06	lymphogen (12/06), pulmonal (02/09), peritoneal (08/13)		3
M-2	66	Invasives duktales Karzinom (re)	09/10			5
M-3	87	Invasives duktales Karzinom (li)	03/11	Zökum (10/12), pulmonal (01/13), hepatisch (02/13)	axillär li (03/13)	1
M-4	72	Invasives lobuläres Karzinom (re)	10/10			1
M-5	81	<i>k.A.</i>	<i>k.A.</i>			1
M-6	69	<i>k.A.</i>	10/06	lymphogen + ossär (10/06)		5
M-7	63	Invasives duktales Karzinom (li)	12/96	ossär (09/11), pulmonal + hepatisch (03/13)	Lokalrezidiv (04/97)	7
M-8	59	Invasives duktales Karzinom (re)	01/05	lymphogen (03/12)	Rezidiv re (01/11)	10
M-9	74	Invasives duktales Karzinom (li)	08/03	ossär + lymphogen (08/03)		7
M-10	62	Invasives duktales Karzinom (li)	06/11			1
M-11	69	Invasives duktales Karzinom (re)	06/98		Lokoregionäres Rezidiv re (03/11)	9
M-12	73	Invasives duktales Karzinom (re)	10/06	lymphogen (10/06)		1
M-13	70	Invasives duktales Karzinom (re)	01/08			1
M-14	79	Invasives lobuläres Karzinom (re)	02/12	lymphogen + ossär (02/12), kutan (11/12)		1
M-15	53	Invasives duktales Karzinom (re)	03/12			2
M-16	43	Invasives duktales Karzinom (re)	07/09			1
M-17	54	Invasives duktales Karzinom (re)	08/11	lymphogen (08/11)		2
M-18	83	Invasives duktales Karzinom (re)	01/10			1
M-19	68	Invasives duktales Karzinom (re)	01/11			1
M-20	73	Invasives duktales Karzinom (re)	11/10	pulmonal (08/11)		1
M-21	78	<i>k.A.</i>	<i>k.A.</i>			1
M-22	67	<i>k.A.</i>	11/92	ossär und hepatisch (08/11)	Lokalrezidiv li (03/96, 04/99, 08/11)	6
M-23	48	Invasives duktales Karzinom (li)	05/08			1
M-24	45	Invasives lobuläres Karzinom (re)	10/03	lymphogen (05/04)	Rezidiv re (11/10)	1
M-25	75	Invasives lobuläres Karzinom (li)	08/03	lymphogen + ossär (08/03), hepatisch (03/12)		10
M-26	71	Invasives duktales Karzinom (bds)	04/04 (li), 08/08 (re)	lymphogen re (04/04 + 10/06), pulmonal (08/12)	Thoraxwand re (02/10)	12
M-27	70	Invasives duktales Karzinom (re)	08/10			1
M-28	63	Invasives duktales Karzinom (li)	04/10	lymphogen (04/10)		1
M-29	75	Invasives duktales Karzinom (li)	12/06			1

M-30	63	Invasives duktales Karzinom (re)	07/11			5
M-31	82	Invasives lobuläres Karzinom (li)	04/12			1
M-32	47	Invasives duktales Karzinom (re)	11/03		Rezidiv (03/10)	1
M-33	48	Invasives duktales Karzinom (re)	03/07	lymphogen (03/07)		1
M-34	52	Invasives duktales Karzinom (re)	09/05	lymphogen (09/05), hepatisch + ossär (12/09)		7
M-35	80	Invasives duktales Karzinom (re+li)	08/08			1
M-36	55	Invasives duktales Karzinom (li)	09/08			1
M-37	82	Invasives duktales Karzinom (li)	08/11	pulmonal + ossär (08/11)		1
M-38	84	Invasives duktales Karzinom (re)	06/09			1
M-39	71	Invasives duktales Karzinom (re)	11/09			1
M-40	56	Invasives duktales Karzinom (li)	02/07			1
M-41	71	Invasives lobuläres Karzinom (re)	07/03		Thoraxwand re (09/11)	1
M-42	66	Invasives lobuläres Karzinom (li)	08/10	lymphogen (08/10)		3
M-43	71	Invasives lobuläres Karzinom (li)	02/12			2
M-44	63	Invasives lobuläres Karzinom (li)	04/96	ossär (11/11)	Rezidiv (11/11)	3
M-45	58	Invasives duktales Karzinom (li)	06/10	lymphogen (06/10)		4
M-46	60	Invasives duktales Karzinom (re)	08/10			1
M-47	70	DCIS (li)	05/12			1
M-48	48	Invasives duktales Karzinom (re)	03/12		Thoraxwand re (12/13)	4
M-49	62	Invasives duktales Karzinom (re)	12/10		DCIS thoraxwandnah (12/10)	1
M-50	50	Invasives duktales Karzinom (re)	08/11			1
M-51	63	Invasives duktales Karzinom (li)	10/11			1
M-52	53	Muzinöses Karzinom (li)	12/10	lymphogen + ossär (12/10)		7
M-53	61	Invasives duktales Karzinom (li)	11/09	lymphogen (11/09)		1
M-54	30	Invasives duktales Karzinom (re)	08/11	lymphogen (03/13)		1
M-55	67	Invasives duktales Karzinom (bds)	04/08			1
M-56	58	Invasives duktales Karzinom (re)	10/11			1
M-57	74	Invasives duktales Karzinom (li)	12/99	pulmonal (12/01)		1
M-58	44	Invasives duktales Karzinom (re)	02/12			1
M-59	53	Invasives duktales Karzinom (li)	03/09	lymphogen (03/09)		1
M-60	67	DCIS (re)	10/97		invas.-duk. re (01/07)	1
M-61	64	Invasives lobuläres Karzinom (re)	05/12	hepatisch + ossär (09/13)		1
M-62	46	Invasives duktales Karzinom (li)	08/10	ossär (05/14)		2
M-63	73	Invasives duktales Karzinom (li)	04/07			1
M-64	91	Invasives lobuläres Karzinom (re)	02/12		Thoraxwand re (07/13)	1
M-65	71	Invasives duktales Karzinom (re)	07/10	lymphogen (07/10), pulmonal + ossär (07/10)		1
M-66	35	DCIS (re)	01/08			1
M-67	61	Invasives duktales Karzinom (re)	09/10			1
M-68	64	DCIS (re)	05/11			1
M-69	66	Invasives duktales Karzinom (bds)	06/10	lymphogen (02/11)		1
M-70	73	Invasives duktales Karzinom (re)	08/08	lymphogen (08/08)		1

M-72	54	Invasives lobuläres Karzinom (re)	01/12	lymphogen (01/12)		5
M-71	56	Invasives duktales Karzinom (re)	04/12			1
M-73	45	<i>k.A.</i>	<i>k.A.</i>			1
M-74	62	Invasives duktales Karzinom (re)	05/12			1
M-75	49	Invasives lobuläres + duktales Karzinom (re)	11/11			1
M-76	64	Invasives duktales Karzinom (re)	01/10	lymphogen (01/10)		1
M-77	64	Invasives lobuläres Karzinom (re)	09/11			1
M-78	57	Invasives lobuläres Karzinom (re)	05/06	ossär (05/06)		4
M-79	57	<i>k.A.</i>	04/11	ossär + hepatisch + pulmonal + pleural + lymphogen (05/06)		4
M-80	70	Invasives medulläres Karzinom (li)	06/10			3
M-81	44	Invasives duktales Karzinom (li)	11/11			11
M-82	89	Invasives duktales Karzinom (li)	02/12			1
M-83	79	Invasives lobuläres Karzinom (re)	01/99			1
M-84	63	Invasives lobuläres Karzinom (li)	04/11			1
M-85	39	Invasives duktales Karzinom (li)	06/99	lymphogen (06/99), pulmonal (12/04), hepatisch (01/05), ovarial (08/08)		1
M-86	51	Invasives duktales Karzinom (re)	07/10	lymphogen (07/10)	Thoraxwand re (02/12)	1
M-87	74	Invasives duktales Karzinom (li)	03/11	lymphogen (03/11), ossäre + pulmonale (04/13)		2
M-88	73	Invasives duktales Karzinom (bds)	1992 (li), 07/05 (re)	kutan (07/07), ossär (01/13)	invas.-duk. li (07/05), Rezidiv bds. (01/13)	1
M-89	71	Invasives duktales Karzinom (re)	11/09	lymphogen (11/09)		1
M-90	71	Invasives duktales Karzinom (re)	03/10	ossär + hepatisch (03/10)		3
M-91	72	DCIS (re)	02/12			1
M-92	64	Invasives duktales Karzinom (li)	03/12			4
M-93	63	Invasives duktales Karzinom (re)	11/11	ossär (11/11), peritoneal (12/11), pulmonal (05/12), hepatisch (09/12)		1
M-94	62	Invasives duktales Karzinom (li)	05/11	lymphogen (05/11)		6
M-95	65	Invasives lobuläres Karzinom (li)	03/12			1
M-96	32	Invasives lobuläres Karzinom (li)	08/07			1
M-97	70	Invasives duktales Karzinom (re) + DCIS	06/08			1
M-98	59	Invasives lobuläres Karzinom (re)	05/09	lymphogen + ossär (05/09), pulmonal (02/13), hepatisch (01/13 + 03/14)		8
M-99	36	Invasives duktales Karzinom (re)	08/11			1
M-100	59	Invasives duktales Karzinom (re)	09/09			1
M-101	73	Invasives duktales Karzinom (re)	09/10			1
M-102	68	DCIS (li), intraduktales Karzinom	03/12			2
M-103	76	Invasives duktales Karzinom (re)	04/08	lymphogen (04/08), ossär (03/09)		3
M-104	62	Invasives duktales Karzinom (re)	03/12			1
M-105	65	Invasives duktales Karzinom (re)	11/11			1
M-106	69	Invasives duktales Karzinom (re)	02/10	lymphogen (02/10)		1

M-107	65	DCIS (re)	03/12			1
M-108	48	Invasives lobuläres + duktales Karzinom (li)	01/11			2
M-109	64	Invasives duktales Karzinom (li)	04/11	lymphogen (04/11)		1
M-110	65	Invasives lobuläres + duktales Karzinom (re)	11/10			1
M-111	67	Invasives lobuläres Karzinom (li)	05/96	lymphogen (05/96)	Thoraxwand (06/11)	1
M-112	75	Invasives duktales Karzinom (re)	10/11	lymphogen (10/11)		7
M-113	31	Invasives duktales Karzinom (re)	10/10	lymphogen (11/10), kutan (07/13)	Lokalrezidiv kutan (05/13)	5
M-114	60	Invasives duktales Karzinom (re)	10/10	lymphogen + ossär (10/10)		8
M-115	36	Invasives duktales Karzinom (re)	10/09	lymphogen (10/09)		1
M-116	76	<i>k.A.</i>	05/02			1
M-117	46	Invasives duktales Karzinom (li)	06/10			11
M-118	62	Invasives lobuläres Karzinom (li)	10/11			4
M-119	64	Invasives duktales Karzinom (re)	12/11			1
M-120	51	<i>k.A.</i>	03/03			1
M-121	49	Invasives duktales Karzinom (li)	10/08	lymphogen (10/08)		1
M-122	71	Invasives duktales Karzinom (li)	04/10			3
M-123	71	DCIS (li)	05/12			1
M-124	69	Invasives duktales Karzinom (re)	03/10			1
M-127	80	Invasives duktales Karzinom (re)	03/11			8
M-125	72	Invasives duktales Karzinom (re)	09/10			1
M-126	72	Invasives duktales Karzinom (re)	12/10			1
M-128	58	Invasives lobuläres Karzinom (li)	03/11			1
M-129	58	Invasives duktales Karzinom (li)	06/06	lymphogen (06/06)		1
M-130	53	DCIS (li)	05/12			1
M-131	71	Invasives duktales Karzinom (li)	06/10			2
M-132	74	Invasives duktales Karzinom (li)	08/11	lymphogen (08/11)		4
M-133	46	Invasives duktales Karzinom (li)	03/09	lymphogen + ossär (08/13)	Thoraxwand (08/13)	3
M-134	75	Invasives duktales Karzinom (re)	05/08			1
M-135	54	Invasives duktales Karzinom (re)	03/12			3
M-136	66	Invasives duktales Karzinom (li)	02/12			3
M-137	79	Invasives duktales Karzinom (re)	07/10	DCIS-Herde (07/10)		3
M-138	41	Invasives duktales Karzinom (re)	04/12			2
M-139	77	Invasives lobuläres Karzinom (li)	05/11			1
M-140	50	Invasives lobuläres Karzinom (re)	03/09			1
M-141	52	Invasives duktales Karzinom (re)	04/12			1
M-142	74	Invasives duktales Karzinom (bds)	01/07 (li), 10/11 (re)			1
M-143	76	Invasives duktales Karzinom (li)	12/04	pulmonal (04/07)		8
M-144	69	Invasives duktales Karzinom (re)	07/08			1
M-145	49	Invasives duktales Karzinom (li)	10/11	lymphogen (10/11)		6
M-146	42	Invasives duktales Karzinom (re)	04/08			1
M-147	70	Invasives duktales Karzinom (re)	01/10			1
M-148	49	DCIS (li)	02/12			1
M-149	54	Invasives duktales Karzinom (re)	04/12			2
M-150	53	Invasives duktales Karzinom (re)	03/11			1

M-151	67	DCIS (li)	08/11			1
M-152	58	Invasives duktales Karzinom (re)	12/09	pulmonal (05/13)	Lokalrezidiv (04/12), endokrin (05/13)	1
M-153	83	Invasives duktales Karzinom (re)	01/05	kutan (02/12)	Lokalrezidiv (03/12)	1
M-154	67	Invasives duktales Karzinom (li)	03/06	lymphogen (03/06), ossär + cerebral + pulmonal (03/09)	Thoraxwand (05/11)	18
M-155	61	Invasives duktales Karzinom (li)	02/08			1
M-156	44	Invasives duktales Karzinom (re)	06/11	lymphogen (06/11)		7
M-157	46	Invasives duktales Karzinom (li)	09/08	ossär + lymphogen (09/08)		5
M-158	76	Invasives duktales Karzinom (li)	05/11			1
M-159	79	Invasives duktales Karzinom (re)	06/10			1
M-160	52	Invasives duktales Karzinom (li)	06/11	lymphogen (06/11)		1

Mammakarzinompatientinnen im Therapieverlauf (vor, während und nach Chemotherapie):

M-161	70	Invasives duktales Karzinom (li)	03/13			
M-162	64	Invasives duktales Karzinom (re)	05/13	lymphogen (05/13)		
M-163	51	Invasives duktales Karzinom (re)	07/10	lymphogen (07/10), ossär (05/13), pulmonal + hepatisch (12/13)	Thoraxwand (02/12)	
M-164	65	Ovarial Karzinom	04/13	lymphogen (04/13)		
M-165	61	Invasives duktales Karzinom (re)	05/13	lymphogen (05/13)		
M-166	66	DCIS (re)	05/13			
M-167	49	Invasives duktales Karzinom (li)	07/13	lymphogen (07/13)		

(DCIS – duktales Karzinom in situ; ED – Erstdiagnose; k.A. – keine Angaben;
bds – beidseitig; li – links; re – rechts)

Auflistung der Daten der separierten Vollblutproben (siehe Kap. 4.1.2)

EDTA-Vollblutprobe			Nicht-separierte Fraktion vor der Anreicherung			Angereicherte Fraktion nach MACS-Separation			Anreicherungs- faktor [%]	CETC-Verteilung (PF/NF) [%]
#	Therapie	Patient-ID	Gesamt- zellzahl pro ml Blut	CETC- Zellzahl pro ml Blut	%	Gesamt- zellzahl in PF	CETC- Zellzahl in PF	%		
1	Trastuzumab	M-2	8.160.000	5.600	0,07	48.000	2.800	5,83	85,0	100/0
2	Nachsorge	M-131	1.738.000	6.600	0,38	144.000	5.868	4,08	10,7	96/4
3	ChTh (Paclitaxel)	M-154	2.885.000	9.000	0,31	176.000	7.776	4,42	14,2	98/2
4	Zoledronsäure	M-13	5.475.000	7.000	0,13	133.600	4.300	3,22	25,2	45/55
5	Nachsorge	M-115	2.581.500	1.200	0,05	118.400	710	0,60	12,9	100/0
6	ChTh (Paclitaxel)	M-90	3.025.000	4.800	0,16	56.800	1.295	2,28	14,4	30/70
7	Zoledronsäure	M-121	4.621.000	8.600	0,19	166.400	13.328	8,01	43,0	80/20
8	ChTh (Paclitaxel)	M-154	4.354.000	1.400	0,03	154.400	1.100	0,71	22,2	41/59
9	Zoledronsäure	M-78	4.160.500	1.400	0,03	200.800	1.900	0,95	28,1	79/21
10	Nachsorge	M-16	6.460.000	4.000	0,06	223.200	1.600	0,72	11,6	57/43
11	Zoledronsäure	M-25	3.990.000	800	0,02	180.800	1.100	0,61	30,3	92/8
12	Zoledronsäure	M-29	2.918.000	3.200	0,11	119.200	2.800	2,35	21,4	83/17
13	Trastuzumab	M-8	5.225.000	6.000	0,11	161.600	2.800	1,73	15,1	80/20
14	ChTh (Paclitaxel)	M-154	2.695.500	600	0,02	132.800	2.300	1,73	77,8	96/4

15	Zoledronsäure	M-59	2.959.500	5.000	0,17	162.400	3.900	2,40	14,2	98/2
16	Tamoxifen	M-86	2.625.000	2.200	0,08	132.000	1.600	1,21	14,5	50/50
17	k.A.	M-124	2.466.500	1.400	0,06	136.000	700	0,51	9,1	66/34
18	Trastuzumab	M-117	1.793.500	5.000	0,28	70.400	2.600	3,69	13,2	72/28
19	Exemestan	M-28	790.000	7.800	0,99	92.000	2.100	2,28	2,3	69/31
20	Ibandronsäure	M-6	9.525.000	3.200	0,03	211.200	2.700	1,28	38,1	79/21
21	Zoledronsäure	M-25	10.540.000	2.400	0,02	272.800	700	0,26	11,3	70/30
22	Zoledronsäure	M-78	14.775.000	8.000	0,05	240.000	3.600	1,50	27,7	46/54
23	ChTh (Paclitaxel)	M-90	3.414.000	5.000	0,15	102.400	500	0,49	3,3	22/78
24	Trastuzumab	M-117	1.726.500	3.600	0,21	82.400	900	1,09	5,2	43/57
25	Zoledronsäure	M-98	4.299.000	1.600	0,04	99.200	900	0,91	24,4	82/18
26	Zoledronsäure	M-96	6.520.000	4.400	0,07	267.200	400	0,15	2,2	9/81
27	Zoledronsäure	M-85	2.348.000	1.600	0,07	100.800	100	0,10	1,5	20/80
28	Nachsorge	M-57	4.066.500	5.000	0,12	176.000	100	0,06	0,5	6/94
29	ChTh (Paclitaxel)	M-65	1.963.500	1.400	0,07	124.000	3.200	2,58	36,2	97/3
30	ChTh (Paclitaxel)	M-90	863.000	3.400	0,39	84.000	2.292	2,73	6,9	31/69
31	Zoledronsäure	M-34	9.585.000	6.000	0,06	103.200	800	0,78	12,4	62/38
32	Trastuzumab	M-26	3.736.500	4.600	0,12	96.800	100	0,10	0,8	100/0
33	Nachsorge	M-122	4.130.500	11.400	0,28	209.600	500	0,24	0,9	83/17
34	Trastuzumab	M-8	2.927.500	2.000	0,07	59.200	1.100	1,86	27,2	41/59
35	Trastuzumab	M-53	4.166.500	6.400	0,15	93.600	800	0,85	5,6	89/11
36	Nachsorge	M-52	3.038.000	31.200	1,03	163.200	2.200	1,35	1,3	71/29
37	Nachsorge	M-100	3.839.500	10.800	0,28	239.200	2.600	1,09	3,9	75/25
38	ChTh (FEC)	M-41	1.605.500	4.600	0,29	71.200	0	0,00	0,0	0/100
39	Trastuzumab	M-117	2.177.500	9.600	0,44	142.400	400	0,28	0,6	31/69
40	Zoledronsäure	M-103	2.351.500	17.600	0,75	296.000	1.100	0,37	0,5	44/56
41	k.A.	M-38	5.525.000	26.200	0,47	176.800	2.200	1,24	2,6	44/56
42	ChTh (Paclitaxel) + Bevacizumab	M-98	17.510.000	4.800	0,03	192.800	6.600	3,42	124,9	81/19
43	Ibandronsäure	M-44	4.221.000	1.600	0,04	108.800	0	0,00	0,0	0/100
44	Nachsorge	M-116	16.800.000	2.800	0,02	200.000	300	0,15	9,0	75/25
45	ChTh (Paclitaxel)	M-154	16.740.000	7.600	0,05	139.200	300	0,22	4,7	50/50
46	Ibandronsäure	M-6	5.370.000	20.640	0,38	160.800	2.200	1,37	3,6	9/91
47	ChTh (FEC)	M-30	5.045.000	3.400	0,07	127.200	0	0,00	0,0	0/100
48	k.A.	M-69	13.920.000	5.538	0,04	133.200	1.500	1,13	28,3	13/87
49	Zoledronsäure	M-25	26.500.000	15.190	0,06	296.800	3.550	1,20	20,9	90/10
50	Nachsorge	M-36	9.120.000	3.200	0,04	146.400	500	0,34	9,7	71/29
51	ChTh (Docetaxel)	M-89	7.285.000	14.668	0,20	166.400	700	0,42	2,1	33/67
52	ChTh (Paclitaxel)	M-154	3.968.500	18.972	0,48	250.400	4.300	1,72	3,6	86/14
53	Nachsorge	M-80	10.905.000	6.200	0,06	249.600	2.400	0,96	16,9	100/0
54	Nachsorge	M-110	5.745.000	12.000	0,21	216.000	1.900	0,88	4,2	63/37
55	Nachsorge	M-159	8.025.000	15.876	0,20	337.600	2.200	0,65	3,3	76/24
56	ChTh (Paclitaxel) + Bevacizumab	M-98	11.495.000	1.400	0,01	161.600	700	0,43	35,6	78/22
57	ChTh (Paclitaxel)	M-154	14.510.000	1.400	0,01	145.600	200	0,14	14,2	25/75
58	Nachsorge	M-32	7.100.000	3.600	0,05	377.600	2.500	0,66	13,1	93/7
59	Exemestan	M-9	32.020.000	15.466	0,05	136.000	1.700	1,25	25,9	71/29
60	Trastuzumab	M-143	8.865.000	5.000	0,06	142.400	100	0,07	1,2	17/83
61	Trastuzumab	M-26	10.395.000	4.200	0,04	148.800	200	0,13	3,3	67/33

62	Zoledronsäure	M-103	24.630.000	22.220	0,09	262.400	2.000	0,76	8,4	53/47
63	Trastuzumab	M-117	19.005.000	9.044	0,05	160.000	500	0,31	6,6	45/55
64	Trastuzumab	M-45	6.625.000	13.034	0,20	267.200	5.300	1,98	10,1	88/12
65	Nachsorge	M-23	11.795.000	7.200	0,06	146.400	500	0,34	5,6	45/55
66	Fulvestrant + Ibandronsäure	M-1	289.200	35.552	12,29	92.000	1.125	1,22	0,1	13/87
67	Trastuzumab	M-8	1.363.000	9.000	0,66	236.000	400	0,17	0,3	57/43
68	Zoledronsäure	M-154	1.179.000	1.800	0,15	117.600	1.100	0,94	6,1	92/8
69	Ibandronsäure	M-6	34.655.000	7.800	0,02	240.000	5.000	2,08	92,6	86/14
70	Zoledronsäure	M-78	11.055.000	2.200	0,02	240.800	1.200	0,50	25,0	75/25
71	Zoledronsäure	M-34	9.775.000	5.800	0,06	176.000	748	0,43	7,2	60/40
72	Nachsorge	M-87	7.020.000	22.528	0,32	149.600	1.000	0,67	2,1	24/76
73	Zoledronsäure	M-133	24.255.000	11.000	0,05	102.400	1.400	1,37	30,1	82/18
74	Zoledronsäure	M-12	9.320.000	1.800	0,02	161.600	600	0,37	19,2	55/45
75	Zoledronsäure	M-25	10.955.000	12.800	0,12	303.200	3.900	1,29	11,0	89/11
76	ChTh (Paclitaxel)	M-154	19.280.000	2.800	0,01	189.600	1.000	0,53	36,3	91/9
77	Trastuzumab	M-106	4.318.000	2.600	0,06	328.800	100	0,03	0,5	100/0
78	Nachsorge	M-122	5.445.000	6.400	0,12	222.400	3.300	1,48	12,6	65/35
79	Trastuzumab	M-147	27.180.000	10.600	0,04	238.400	1.700	0,71	18,3	71/29
80	ChTh (Docetaxel)	M-156	10.740.000	200	0,00	104.000	100	0,10	51,6	100/0
81	Trastuzumab	M-137	4.643.500	10.800	0,23	174.400	0	0,00	0,0	0/100
82	Nachsorge	M-144	3.093.000	7.800	0,25	120.800	300	0,25	1,0	43/57
83	Nachsorge	M-150	15.175.000	432	0,00	225.600	292	0,13	45,4	100/0
84	Trastuzumab	M-26	5.345.000	2.200	0,04	121.600	0	0,00	0,0	0/100
85	vor OP	M-87	8.515.000	13.200	0,16	69.600	900	1,29	8,3	64/36
86	Trastuzumab	M-117	6.455.000	600	0,01	161.600	300	0,19	20,0	50/50
87	Zoledronsäure	M-9	19.310.000	7.200	0,04	247.200	2.300	0,93	25,0	59/41
88	ChTh (FEC)	M-30	6.600.000	2.600	0,04	238.400	200	0,08	2,1	50/50
89	Trastuzumab	M-45	10.275.000	14.400	0,14	172.000	1.900	1,10	7,9	68/32
90	Trastuzumab	M-8	7.370.000	4.400	0,06	145.600	800	0,55	9,2	80/20
91	vor OP	M-112	7.115.000	3.600	0,05	122.400	2.948	2,41	47,6	88/12
92	ChTh (Paclitaxel)	M-154	3.059.000	6.888	0,23	184.800	2.100	1,14	5,0	95/5
93	Trastuzumab	M-2	26.940.000	2.600	0,01	218.400	500	0,23	23,7	42/58
94	ChTh (TAC)	M-54	34.080.000	2.000	0,01	216.000	400	0,19	31,6	36/64
95	Zoledronsäure	M-111	28.125.000	8.000	0,03	199.200	2.300	1,15	40,6	85/15
96	Trastuzumab	M-127	27.580.000	10.400	0,04	228.000	1.800	0,79	20,9	67/33
97	Nachsorge	M-24	10.710.000	336.848	3,15	295.500	170.085	5,76	1,8	100/0
98	Nachsorge	M-55	33.020.000	800	0,00	357.600	600	0,17	69,3	86/14
99	ChTh (EC)	M-145	17.620.000	10.600	0,06	459.200	200	0,04	0,7	20/80
100	Ibandronsäure	M-44	2.822.500	2.800	0,10	209.600	1.200	0,57	5,8	92/8
101	Zoledronsäure	M-154	4.637.000	3.800	0,08	217.600	2.400	1,10	13,5	80/20
102	Zoledronsäure	M-88	13.550.000	9.000	0,07	236.000	300	0,13	1,9	100/0
103	Zoledronsäure	M-129	28.115.000	7.400	0,03	247.200	300	0,12	4,6	50/50
104	Zoledronsäure	M-11	9.575.000	2.400	0,03	103.200	1.300	1,26	50,3	100/0
105	ChTh (Docetaxel)	M-20	11.715.000	1.248	0,01	167.200	1.300	0,78	73,0	77/23
106	Ibandronsäure	M-6	12.470.000	11.142	0,09	248.000	1.000	0,40	4,5	51/49
107	Zoledronsäure	M-34	4.869.000	1.200	0,02	220.000	600	0,27	11,1	100/0
108	Trastuzumab	M-45	2.865.000	13.680	0,48	229.600	600	0,26	0,5	100/0

109	ChTh (Paclitaxel) + Bevacizumab	M-98	7.175.000	4.800	0,07	287.200	1.900	0,66	9,9	100/0
110	Zoledronsäure	M-25	6.740.000	41.168	0,61	675.200	23.560	3,49	5,7	99/1
111	Trastuzumab	M-117	2.739.500	800	0,03	133.600	300	0,22	7,7	60/40
112	Trastuzumab	M-113	14.980.000	19.866	0,13	192.000	5.200	2,71	20,4	100/0
113	Nachsorge	M-128	8.160.000	1.400	0,02	230.400	200	0,09	5,1	100/0
114	ChTh (Docetaxel)	M-30	10.595.000	1.200	0,01	601.600	744	0,12	10,9	100/0
115	ChTh (Paclitaxel) + Bevacizumab	M-98	14.940.000	3.600	0,02	726.400	2.700	0,37	15,4	100/0
116	vor OP	M-81	35.735.000	42.624	0,12	314.400	1.600	0,51	4,3	44/56
117	ChTh (Paclitaxel) + Vinorelbin	M-158	34.130.000	600	0,00	252.000	400	0,16	90,3	100/0
118	Trastuzumab	M-2	5.190.000	3.600	0,07	468.800	1.500	0,32	4,6	71/29
119	Nachsorge	M-42	6.225.000	1.200	0,02	480.800	300	0,06	3,2	60/40
120	Trastuzumab	M-127	31.975.000	2.800	0,01	363.200	1.800	0,50	56,6	83/17
121	Zoledronsäure	M-9	31.870.000	7.000	0,02	172.800	2.000	1,16	52,7	87/13
122	Trastuzumab	M-143	33.440.000	2.600	0,01	143.200	200	0,14	18,0	100/0
123	Zoledronsäure	M-52	9.010.000	15.042	0,17	126.400	2.000	1,58	9,5	69/31
124	Zoledronsäure	M-63	13.145.000	5.800	0,04	248.000	1.300	0,52	11,9	52/48
125	Zoledronsäure	M-22	8.640.000	800	0,01	176.000	300	0,17	18,4	100/0
126	Trastuzumab	M-45	21.135.000	9.000	0,04	213.600	2.200	1,03	24,2	96/4
127	Nachsorge	M-108	28.540.000	1.600	0,01	208.800	200	0,10	17,1	100/0
128	ChTh (EC)	M-112	24.860.000	200	0,00	224.000	800	0,36	443,9	47/53
129	Zoledronsäure	M-114	19.255.000	6.200	0,03	106.400	300	0,28	8,8	100/0
130	Zoledronsäure	M-34	2.393.500	400	0,02	97.600	100	0,10	6,1	50/50
131	Ibandronsäure	M-6	20.090.000	5.200	0,03	154.400	3.600	2,33	90,1	75/25
132	ChTh (Docetaxel)	M-30	12.525.000	0	0,00	234.400	0	0,00		0/0
133	ChTh (EC)	M-112	4.612.000	1.000	0,02	204.000	100	0,05	2,3	33/67
134	ChTh (FEC)	M-118	13.805.000	0	0,00	140.800	100	0,07	0,1	50/50
135	Trastuzumab	M-26	19.420.000	3.200	0,02	160.000	100	0,06	3,8	20/80
136	Trastuzumab	M-117	9.060.000	2.800	0,03	103.200	0	0,00	0,0	0/100
137	Capecitabin	M-154	25.415.000	800	0,00	186.400	600	0,32	102,3	27/73
138	Zoledronsäure	M-7	12.515.000	132.928	1,06	125.600	30.804	24,53	23,1	96/4
139	Zoledronsäure	M-52	2.644.500	31.824	1,20	65.600	2.600	3,96	3,3	55/45
140	Trastuzumab	M-113	7.850.000	29.146	0,37	179.200	11.277	6,29	16,9	90/10
141	ChTh (FEC)	M-151	23.630.000	200	0,00	119.200	0	0,00		0/0
142	Nachsorge	M-80	2.998.000	15.540	0,52	169.600	3.600	2,12	4,1	26/74
143	Nachsorge	M-146	13.335.000	1.200	0,01	180.000	500	0,28	30,9	56/44
144	Trastuzumab	M-8	3.685.000	14.040	0,38	107.200	900	0,84	2,2	75/25
145	Zoledronsäure	M-103	8.675.000	28.930	0,33	216.800	8.816	4,07	12,2	79/21
146	Nachsorge	M-125	19.145.000	18.648	0,10	133.600	1.100	0,82	8,5	42/58
147	Trastuzumab	M-2	12.255.000	7.200	0,06	176.000	1.100	0,63	10,6	69/31
148	Ibandronsäure	M-44	61.150.000	800	0,00	128.000	700	0,55	418,0	78/22
149	Nachsorge	M-21	31.795.000	1.200	0,00	173.600	500	0,29	76,3	63/37
150	Nachsorge	M-50	21.055.000	800	0,00	213.600	500	0,23	61,6	45/55
151	Nachsorge	M-99	17.605.000	1.200	0,01	216.000	300	0,14	20,4	75/25
152	Trastuzumab	M-67	11.565.000	1.200	0,01	99.200	700	0,71	68,0	78/22
153	ChTh (EC)	M-145	12.290.000	3.000	0,02	152.000	700	0,46	18,9	64/36
154	Nachsorge	M-3	3.453.000	20.664	0,60	149.600	2.400	1,60	2,7	37/63

155	Zoledronsäure	M-37	30.705.000	6.400	0,02	124.800	900	0,72	34,6	100/0
156	ChTh (EC)	M-112	34.715.000	400	0,00	390.400	200	0,05	44,5	29/71
157	ChTh (FEC)	M-118	5.720.000	200	0,00	145.600	0	0,00		0/0
158	Trastuzumab	M-117	3.480.500	1.600	0,05	125.600	300	0,24	5,2	33/67
159	Capecitabin	M-154	15.000.000	1.400	0,01	123.200	500	0,41	43,5	63/37
160	Trastuzumab	M-156	16.600.000	2.200	0,01	132.800	400	0,30	22,7	67/33
161	Nachsorge	M-27	20.120.000	6.400	0,03	153.600	1.400	0,91	28,7	56/44
162	Nachsorge	M-70	27.400.000	4.598	0,02	292.000	800	0,27	16,3	73/27
163	Trastuzumab	M-113	51.150.000	4.600	0,01	159.200	300	0,19	21,0	20/80
164	Zoledronsäure	M-7	7.970.000	13.200	0,17	182.400	4.100	2,25	13,6	42/58
165	Zoledronsäure	M-79	19.075.000	1.400	0,01	151.200	1.300	0,86	117,1	33/67
166	Trastuzumab	M-114	11.580.000	3.200	0,03	306.400	12.036	3,93	142,2	100/0
167	Nachsorge	M-8	21.540.000	18.096	0,08	71.200	2.300	3,23	38,5	100/0
168	Zoledronsäure	M-154	3.235.500	33.720	1,04	89.600	1.800	2,01	1,9	15/85
169	Zoledronsäure	M-34	32.660.000	800	0,00	172.000	900	0,52	213,6	100/0
170	ChTh (EC)	M-112	14.590.000	0	0,00	276.800	400	0,14	0,1	100/0
171	Nachsorge	M-118	10.425.000	2.448	0,02	264.800	200	0,08	3,2	100/0
172	Zoledronsäure	M-25	7.125.000	5.000	0,07	621.600	4.000	0,64	9,2	95/5
173	Trastuzumab	M-26	3.990.000	1.400	0,04	154.400	700	0,45	12,9	88/12
174	Trastuzumab	M-117	2.979.500	4.784	0,16	150.400	1.300	0,86	5,4	72/28
175	Zoledronsäure	M-157	5.960.000	20.468	0,34	248.000	800	0,32	0,9	80/20
176	Zoledronsäure	M-78	5.160.000	3.800	0,07	242.400	400	0,17	2,2	80/20
177	Trastuzumab	M-156	6.155.000	5.400	0,09	342.400	600	0,18	2,0	55/45
178	Trastuzumab	M-8	17.385.000	4.000	0,02	183.200	200	0,11	4,7	100/0
179	Nachsorge	M-72	7.475.000	4.400	0,06	136.800	300	0,22	3,7	100/0
180	Trastuzumab	M-94	6.090.000	2.304	0,04	264.800	300	0,11	3,0	100/0
181	Trastuzumab	M-113	20.100.000	16.320	0,08	420.000	5.152	1,23	15,1	100/0
182	Trastuzumab	M-2	27.250.000	5.000	0,02	276.000	4.600	1,67	90,8	100/1
183	Nachsorge	M-84	49.445.000	1.600	0,00	140.000	1.300	0,93	287,0	100/0
184	Zoledronsäure	M-97	2.817.000	0	0,00	180.000	180	0,10	0,1	100/0
185	Trastuzumab	M-11	4.041.000	2.600	0,06	553.600	400	0,07	1,1	67/33
186	ChTh (Paclitaxel)	M-22	4.280.000	400	0,01	264.000	0	0,00	0,0	0/100
187	Trastuzumab	M-127	3.684.500	12.600	0,34	233.600	2.300	0,98	2,9	100/0
188	ChTh (Docetaxel)	M-145	4.283.000	7.400	0,17	446.400	2.800	0,63	3,6	52/48
189	Zoledronsäure	M-9	3.683.000	7.456	0,20	281.600	3.100	1,10	5,4	86/14
190	Zoledronsäure	M-122	3.668.000	7.400	0,20	246.400	3.100	1,26	6,2	61/39
191	vor OP	M-91	4.351.000	3.600	0,08	124.000	600	0,48	5,8	86/14
192	vor OP	M-136	3.697.500	2.000	0,05	132.800	100	0,08	1,4	100/0
193	Nachsorge	M-137	4.075.000	5.600	0,14	144.000	3.000	2,08	15,2	94/6
194	Zoledronsäure	M-7	2.487.500	10.400	0,42	160.800	2.200	1,37	3,3	100/0
195	Trastuzumab	M-143	3.505.500	600	0,02	264.800	500	0,19	11,0	83/17
196	ChTh (Docetaxel)	M-81	3.259.000	800	0,02	164.000	500	0,30	12,4	63/37
197	Zoledronsäure	M-52	3.026.000	9.200	0,30	448.800	3.900	0,87	2,9	59/41
198	ChTh (Paclitaxel) & Bevacizumab	M-98	2.837.000	2.200	0,08	244.800	500	0,20	2,6	100/0
199	Zoledronsäure	M-18	4.985.500	14.840	0,30	339.200	1.400	0,41	1,4	100/0
200	Nachsorge	M-42	4.165.000	8.400	0,20	176.000	2.900	1,65	8,2	100/0
201	Nachsorge	M-155	4.517.500	1.400	0,03	263.200	200	0,08	2,5	67/33

202	Fulvestrant + Ibandronsäure	M-1	5.275.000	4.000	0,08	308.800	2.100	0,68	9,0	95/5
203	Trastuzumab	M-26	3.819.000	1.600	0,04	221.600	800	0,36	8,6	80/20
204	vor OP	M-43	3.770.000	3.200	0,08	101.600	600	0,59	7,0	75/25
205	vor OP	M-82	1.764.000	11.428	0,65	165.600	666	0,40	0,6	100/0
206	Trastuzumab	M-117	2.931.000	3.600	0,12	155.200	400	0,26	2,1	67/33
207	Trastuzumab	M-156	4.095.000	2.000	0,05	144.800	100	0,07	1,4	50/50
208	Zoledronsäure	M-154	2.173.500	1.400	0,06	101.600	1.500	1,48	22,9	100/0
209	vor Stanze	M-48	5.270.000	2.200	0,04	247.200	100	0,04	1,0	50/50
210	vor OP	M-58	2.915.500	2.000	0,07	116.800	200	0,17	2,5	100/0
211	Zoledronsäure	M-83	3.734.500	3.000	0,08	173.600	200	0,12	1,4	50/50
212	Nachsorge	M-133	7.760.000	5.000	0,06	120.800	500	0,41	6,4	83/17
213	vor OP	M-153	1.840.000	800	0,04	65.600	200	0,30	7,0	100/0
214	Zoledronsäure	M-34	3.984.000	600	0,02	120.800	2.100	1,74	115,4	91/9
215	Nachsorge	M-108	6.490.000	2.000	0,03	108.800	1.100	1,01	32,8	85/15
216	Nachsorge	M-112	3.537.000	3.800	0,11	307.200	600	0,20	1,8	60/40
217	Nachsorge	M-113	6.195.000	49.520	0,80	215.200	500	0,23	0,3	63/37
218	Trastuzumab	M-8	16.100.000	12.672	0,08	233.600	500	0,21	2,7	80/20
219	Zoledronsäure	M-25	6.280.000	22.896	0,36	379.200	900	0,24	0,7	69/31
220	Nachsorge	M-76	10.470.000	27.440	0,26	195.200	1.300	0,67	2,5	38/62
221	Zoledronsäure	M-157	12.160.000	17.200	0,14	257.600	2.100	0,82	5,8	84/16
222	Trastuzumab	M-11	1.729.000	9.000	0,52	138.400	900	0,65	1,2	60/40
223	Trastuzumab	M-127	3.900.000	20.286	0,52	317.600	7.074	2,23	4,3	96/4
224	ChTh (Docetaxel)	M-145	6.445.000	14.080	0,22	243.200	5.900	2,43	11,1	94/6
225	Nachsorge	M-120	4.598.500	3.200	0,07	165.600	900	0,54	7,8	90/10
226	vor OP	M-135	1.874.500	3.200	0,17	310.400	2.200	0,71	4,2	67/33
227	Nachsorge	M-140	1.845.000	2.400	0,13	372.800	1.400	0,38	2,9	93/7
228	ChTh (Docetaxel)	M-81	5.145.000	14.642	0,28	501.600	2.900	0,58	2,0	50/50
229	Trastuzumab	M-143	4.026.500	6.200	0,15	170.400	1.200	0,70	4,6	50/50
230	Nachsorge	M-160	5.060.000	3.200	0,06	178.400	1.200	0,67	10,6	100/0
231	Nachsorge	M-19	4.245.000	5.200	0,12	140.800	100	0,07	0,6	25/75
232	Nachsorge	M-131	14.270.000	10.800	0,08	133.600	200	0,15	2,0	40/60
233	Zoledronsäure	M-9	4.896.000	3.800	0,08	308.000	600	0,19	2,5	86/14
234	vor OP	M-15	3.066.000	7.000	0,23	232.000	200	0,09	0,4	100/0
235	Trastuzumab	M-26	3.336.500	200	0,01	112.800	100	0,09	14,8	100/0
236	vor OP	M-92	3.271.000	1.400	0,04	127.200	0	0,00		0/0
237	Trastuzumab	M-117	2.363.000	600	0,03	121.600	0	0,00		0/0
238	Trastuzumab	M-156	5.050.000	1.800	0,04	203.200	200	0,10	2,8	100/0
239	Zoledronsäure	M-7	3.017.000	31.578	1,05	250.400	9.577	3,82	3,7	100/0
240	Zoledronsäure	M-52	4.437.000	110.704	2,50	256.000	49.725	19,42	7,8	100/0
241	Zoledronsäure	M-98	4.534.500	5.242	0,12	300.800	4.400	1,46	12,7	88/12
242	Nachsorge	M-10	3.065.500	14.200	0,46	168.000	1.100	0,65	1,4	50/50
243	Zoledronsäure	M-22	3.419.000	4.200	0,12	224.000	2.000	0,89	7,3	100/0
244	Nachsorge	M-40	3.161.000	4.200	0,13	140.800	3.600	2,56	19,2	95/5
245	Nachsorge	M-49	2.460.000	4.000	0,16	241.600	1.000	0,41	2,5	100/0
246	Zoledronsäure	M-93	3.171.000	800	0,03	220.800	100	0,05	1,8	100/0
247	Zoledronsäure	M-154	4.687.000	0	0,00	324.800	0	0,00		0/0
248	ChTh (Paclitaxel)	M-22	3.711.000	1.000	0,03	258.400	400	0,15	5,7	57/43

249	Zoledronsäure	M-25	6.420.000	7.400	0,12	107.800	7.300	0,68	5,9	94/6
250	Nachsorge	M-68	3.169.000	3.400	0,11	190.400	700	0,37	3,4	78/22
251	Nachsorge	M-126	7.065.000	5.400	0,08	279.200	1.100	0,39	5,2	79/21
252	Zoledronsäure	M-34	3.952.500	800	0,02	354.400	500	0,14	7,0	100/0
253	ChTh (Docetaxel)	M-81	6.105.000	4.400	0,07	470.400	1.300	0,28	3,8	54/46
254	Trastuzumab	M-114	4.856.500	9.800	0,20	322.400	1.900	0,59	2,9	100/0
255	Trastuzumab	M-143	4.284.500	600	0,01	285.600	100	0,04	2,5	100/0
256	Zoledronsäure	M-157	4.197.500	1.800	0,04	323.200	500	0,15	3,6	100/0
257	vor Radiatio	M-148	2.385.000	11.302	0,47	234.400	1.300	0,55	1,2	72/28
258	Zoledronsäure	M-35	3.993.000	400	0,01	164.000	2.530	1,54	154,0	100/0
259	Zoledronsäure	M-133	5.185.000	600	0,01	376.000	10.912	2,90	250,8	95/5
260	Trastuzumab	M-26	3.012.500	200	0,01	154.400	600	0,39	58,5	100/0
261	vor OP	M-95	3.164.500	1.200	0,04	120.800	300	0,25	6,5	75/25
262	vor OP	M-141	2.445.000	0	0,00	205.600	200	0,10	0,1	100/0
263	Trastuzumab	M-156	3.974.500	1.800	0,05	181.600	800	0,44	9,7	100/0
264	Nachsorge	M-4	3.161.000	1.080	0,03	273.600	11.544	4,22	123,5	97/3
265	Nachsorge	M-73	4.551.500	25.842	0,57	236.000	7.700	3,26	5,7	73/27
266	Zoledronsäure	M-25	5.965.000	3.400	0,06	139.400	1.800	0,13	2,3	100/0
267	vor Radiatio	M-112	4.344.500	12.800	0,29	156.800	3.200	2,04	6,9	89/11
268	Zoledronsäure	M-134	3.777.000	1.600	0,04	166.400	1.000	0,60	14,2	100/0
269	Zoledronsäure	M-7	4.897.000	5.200	0,11	137.400	300	0,22	2,1	100/0
270	Zoledronsäure	M-52	4.586.000	1.800	0,04	222.400	4.400	1,98	50,4	98/2
271	ChTh (EC)	M-48	7.210.000	0	0,00	326.400	0	0,00		0/0
272	Zoledronsäure	M-79	3.844.500	316	0,01	215.200	200	0,09	11,3	100/0
273	Trastuzumab	M-94	4.417.000	1.800	0,04	300.800	300	0,10	2,4	100/0
274	Nachsorge	M-118	4.335.500	1.000	0,02	418.400	400	0,10	4,1	100/0
275	Nachsorge	M-30	6.375.000	44.930	0,70	679.200	29.920	4,41	6,3	99/1
276	Trastuzumab	M-127	5.590.000	400	0,01	142.400	100	0,07	9,8	50/50
277	vor Radiatio	M-132	5.415.000	1.876	0,03	361.600	1.000	0,28	8,0	42/58
278	Trastuzumab	M-11	2.913.000	9.440	0,32	230.400	7.965	3,46	10,7	90/10
279	ChTh (Docetaxel)	M-81	7.120.000	200	0,00	461.600	900	0,19	69,4	49/51
280	Nachsorge	M-145	7.990.000	3.600	0,05	708.000	3.700	0,52	11,6	69/31
281	Fulvestrant + Ibandronsäure	M-1	3.618.500	11.400	0,32	308.000	400	0,13	0,4	24/76
282	ChTh (Paclitaxel)	M-22	3.464.500	1.800	0,05	345.600	1.000	0,29	5,6	67/33
283	Trastuzumab	M-114	3.073.000	33.532	1,09	373.600	600	0,16	0,1	55/45
284	vor Radiatio	M-64	3.895.500	1.400	0,04	205.600	200	0,10	2,7	22/78
285	Lapatinib	M-8	3.822.500	8.200	0,21	269.600	800	0,30	1,4	80/20
286	Nachsorge	M-33	5.025.000	6.000	0,12	319.200	700	0,22	1,8	88/12
287	Nachsorge	M-39	4.223.000	3.600	0,09	340.800	1.100	0,32	3,8	79/21
288	vor Radiatio	M-135	5.040.000	14.200	0,28	390.400	9.462	2,42	8,6	83/17
289	Zoledronsäure	M-25	6.270.000	0	0,00	792.800	0	0,00		0/0
290	Trastuzumab	M-26	2.782.500	1.000	0,04	234.400	400	0,17	4,7	100/0
291	Trastuzumab	M-156	4.673.000	800	0,02	309.600	0	0,00		0/0
292	Zoledronsäure	M-157	588.000	2.400	0,41	113.600	400	0,35	0,9	100/0
293	vor Radiatio	M-51	5.505.000	25.418	0,46	482.400	5.500	1,14	2,5	82/18
294	Nachsorge	M-81	4.364.500	18.544	0,42	338.400	12.835	3,79	8,9	92/8
295	während Radiatio	M-135	4.511.000	15.128	0,34	345.600	5.300	1,53	4,6	96/4

296	vor OP	M-145	3.534.500	12.000	0,34	454.400	2.500	0,55	1,6	89/11
297	vor Radiatio	M-15	3.413.000	600	0,02	621.600	100	0,02	0,9	33/67
298	vor Radiatio	M-104	3.533.000	800	0,02	631.200	300	0,05	2,1	60/40
299	Zoledronsäure	M-62	3.684.500	6.200	0,17	515.200	900	0,17	1,0	100/0
300	ChTh (Docetaxel)	M-72	6.080.000	800	0,01	312.800	100	0,03	2,4	100/0
301	Trastuzumab	M-11	1.556.500	13.000	0,84	372.800	3.600	0,97	1,2	88/12
302	Trastuzumab	M-127	2.068.000	34.638	1,67	379.200	3.000	0,79	0,5	93/75
303	Trastuzumab	M-132	2.583.000	72.312	2,80	480.800	14.700	3,06	1,1	97/3
304	Nachsorge	M-5	2.999.000	6.642	0,22	584.000	3.800	0,65	2,9	95/5
305	Nachsorge	M-46	7.315.000	3.000	0,04	340.000	2.300	0,68	16,5	92/8
306	ChTh (Docetaxel)	M-72	1.687.500	3.200	0,19	339.200	1.000	0,29	1,6	100/0
307	Zoledronsäure	M-79	2.647.000	6.200	0,23	183.200	2.300	1,26	5,4	88/12
308	Trastuzumab	M-114	6.590.000	5.000	0,08	320.000	6.900	2,16	28,4	95/5
309	Trastuzumab	M-143	3.641.500	400	0,01	304.000	1.500	0,49	44,9	100/0
310	Lapatinib	M-8	2.163.000	21.450	0,99	237.600	1.200	0,51	0,5	100/0
311	vor OP	M-123	4.098.000	200	0,00	220.000	300	0,14	27,9	100/0
312	vor OP	M-152	1.538.500	6.400	0,42	185.600	400	0,22	0,5	100/0
313	Trastuzumab	M-26	3.887.000	0	0,00	227.200	0	0,00	0,0	0/100
314	Trastuzumab	M-81	2.119.000	2.200	0,10	216.800	5.100	2,35	22,7	94/6
315	Zoledronsäure	M-154	3.007.000	600	0,02	224.800	1.400	0,62	31,2	88/12
316	Zoledronsäure	M-98	2.559.500	3.600	0,14	317.600	500	0,16	1,1	100/0
317	vor Radiatio	M-102	2.965.000	200	0,01	200.800	100	0,05	7,4	100/0
318	nach Radiatio	M-43	3.143.000	200	0,01	314.400	0	0,00		0/0
319	Nachsorge	M-109	3.445.000	6.400	0,19	214.400	200	0,09	0,5	100/0
320	Nachsorge	M-42	3.359.000	5.600	0,17	235.200	300	0,13	0,8	60/40
321	ChTh (Docetaxel)	M-136	2.870.000	400	0,01	134.400	0	0,00		0/0
322	Trastuzumab	M-94	1.263.000	2.000	0,16	352.000	300	0,09	0,5	100/0
323	Zoledronsäure	M-114	4.153.500	6.400	0,15	260.800	3.800	1,46	9,5	97/3
324	nach Radiatio	M-132	3.993.000	11.400	0,29	228.000	2.300	1,01	3,5	61/39
325	Zoledronsäure	M-157	3.608.000	4.000	0,11	242.400	400	0,17	1,5	100/0
326	Trastuzumab	M-11	2.208.500	800	0,04	160.000	0	0,00		0/0
327	ChTh (Docetaxel)	M-72	3.644.500	0	0,00	224.000	0	0,00	0,0	0/100
328	Nachsorge	M-94	2.680.500	1.000	0,04	167.200	0	0,00		0/0
329	vor OP	M-47	2.685.500	11.400	0,42	281.600	1.200	0,43	1,0	86/14
330	vor OP	M-138	4.457.000	600	0,01	333.600	200	0,06	4,5	100/0
331	Zoledronsäure	M-7	2.391.000	20.040	0,84	179.200	100	0,06	0,1	100/0
332	Zoledronsäure	M-9	1.763.000	2.200	0,12	308.800	700	0,23	1,8	88/12
333	Zoledronsäure	M-79	2.926.000	5.200	0,18	196.000	1.400	0,71	4,0	88/12
334	Trastuzumab	M-81	1.913.000	18.600	0,97	162.400	2.300	1,42	1,5	53/47
335	ChTh (Docetaxel)	M-48	4.675.500	200	0,00	190.400	0	0,00		0/0
336	Trastuzumab	M-94	2.783.000	2.800	0,10	172.800	500	0,29	2,9	100/0
337	ChTh (Docetaxel)	M-136	5.145.000	0	0,00	205.600	0	0,00	0,0	0/100
338	vor Radiatio	M-71	6.765.000	6.400	0,09	201.600	900	0,45	4,7	90/10
339	ChTh (FEC)	M-92	8.675.000	0	0,00	398.400	0	0,00		0/0
340	Trastuzumab	M-11	2.454.000	8.400	0,34	268.800	1.600	0,60	1,7	47/53
341	ChTh (Docetaxel)	M-72	3.223.000	200	0,01	232.000	0	0,00	0,0	0/100
342	Trastuzumab	M-132	4.361.000	8.640	0,20	202.400	7.000	3,46	17,5	71/29
343	Nachsorge	M-66	2.749.500	1.800	0,07	266.400	200	0,08	1,1	100/0

344	Nachsorge	M-101	2.817.000	19.388	0,69	292.000	2.300	0,79	1,1	76/24
345	vor Radiatio	M-17	4.327.500	3.600	0,08	210.400	900	0,43	5,1	82/18
346	ChTh (Bendamustin)	M-26	8.685.000	1.400	0,02	322.400	0	0,00	0,0	0/100
347	Trastuzumab	M-143	3.651.000	1.000	0,03	239.200	100	0,04	1,5	25/75
348	vor Radiatio	M-149	13.515.000	11.400	0,08	395.200	900	0,23	2,7	90/10
349	Nachsorge	M-60	3.412.000	12.000	0,35	328.000	600	0,18	0,5	50/50
350	Zoledronsäure	M-62	2.835.500	1.600	0,06	135.200	0	0,00		0/0
351	Zoledronsäure	M-139	2.253.000	600	0,03	218.400	100	0,05	1,7	100/0
352	nach Radiatio	M-102	2.063.000	3.800	0,18	169.600	0	0,00		0/0
353	nach Radiatio	M-14	2.244.000	5.000	0,22	288.800	700	0,24	1,1	100/0
354	Trastuzumab	M-81	2.517.000	21.004	0,83	296.000	1.400	0,47	0,6	100/0
355	vor Radiatio	M-74	5.440.000	2.200	0,04	268.000	1.800	0,67	16,6	100/0
356	Zoledronsäure	M-9	2.429.000	1.600	0,07	340.000	0	0,00		0/0
357	Trastuzumab	M-94	2.338.500	800	0,03	148.000	0	0,00		0/0
358	nach Radiatio	M-107	3.979.000	400	0,01	221.600	600	0,27	26,9	75/25
359	vor OP	M-142	3.653.500	200	0,01	217.600	200	0,09	16,8	100/0
360	Zoledronsäure	M-52	3.618.000	17.366	0,48	322.400	800	0,25	0,5	100/0
361	ChTh (Docetaxel)	M-92	4.435.000	0	0,00	348.800	0	0,00		0/0
362	Nachsorge	M-137	3.339.000	5.400	0,16	300.000	700	0,23	1,4	78/22
363	nach Radiatio	M-56	2.246.500	16.128	0,72	386.400	4.100	1,06	1,5	100/0
364	nach Radiatio	M-81	2.335.000	16.500	0,71	217.600	2.300	1,06	1,5	85/15
365	vor Radiatio	M-130	3.390.500	2.000	0,06	159.200	600	0,38	6,4	86/14
366	Trastuzumab	M-11	1.323.000	0	0,00	66.400	0	0,00		0/0
367	nach Radiatio	M-105	3.925.500	2.200	0,06	125.600	0	0,00		0/0
368	Trastuzumab	M-114	2.578.000	600	0,02	212.000	100	0,05	2,0	100/0
369	Trastuzumab	M-127	2.661.000	600	0,02	236.800	100	0,04	1,9	100/0
370	Trastuzumab	M-143	3.226.500	400	0,01	104.800	200	0,19	15,4	100/0
371	Zoledronsäure	M-154	988.500	200	0,02	104.800	200	0,19	9,4	100/0
372	Zoledronsäure	M-22	7.275.000	0	0,00	509.600	0	0,00		0/0
373	ChTh (Bendamustin)	M-26	2.419.500	200	0,01	145.600	400	0,27	33,2	100/0
374	ChTh (Docetaxel)	M-48	3.602.500	600	0,02	359.200	200	0,06	3,3	67/33
375	vor Radiatio	M-61	2.959.000	1.600	0,05	104.000	400	0,38	7,1	80/20
376	Trastuzumab	M-81	3.050.000	1.600	0,05	153.600	300	0,20	3,7	100/0
377	Nachsorge	M-80	4.745.000	9.300	0,20	235.200	1.400	0,60	3,0	82/18
378	ChTh (Docetaxel)	M-92	3.158.500	600	0,02	290.400	900	0,31	16,3	60/40
379	vor Radiatio	M-119	5.355.000	3.600	0,07	408.000	1.100	0,27	4,0	75/25
380	Trastuzumab	M-11	2.157.000	10.200	0,47	259.200	0	0,00	0,0	0/100
381	nach Radiatio	M-77	3.715.500	1.600	0,04	184.000	200	0,11	2,5	100/0
382	Denosumab	M-7	3.161.000	8.800	0,28	223.200	5.900	2,64	9,5	95/5
383	Trastuzumab	M-114	4.307.500	75.600	1,76	353.600	14.076	3,98	2,3	92/8
384	Trastuzumab	M-127	3.185.500	29.862	0,94	400.800	3.700	0,92	1,0	72/28
385	nach Radiatio	M-17	3.297.000	1.600	0,05	424.000	4.000	0,94	19,4	95/5
386	ChTh (FEC)	M-138	2.333.000	0	0,00	518.400	300	0,06	0,1	75/25
387	Capecitabin	M-154	2.485.000	1.600	0,06	159.200	1.200	0,75	11,7	93/7
388	vor Radiatio	M-31	6.135.000	800	0,01	290.400	0	0,00		0/0
389	nach Radiatio	M-75	4.031.500	1.400	0,03	264.800	200	0,08	2,2	23/77
390	nach Radiatio	M-149	3.425.500	40.186	1,17	257.600	1.000	0,39	0,3	100/0

Mammakarzinompatientinnen im Therapieverlauf (vor, während und nach Chemotherapie):

1	vor ChTh	M-161	2.879.500	2.750	0,10	220.800	500	0,23	2,37	67/33
2	ChTh (EC)		3.413.500	0	0,00	215.200	200	0,09		100/0
3	ChTh (EC)		6.590.000	0	0,00	645.600	50	0,01		100/0
4	ChTh (EC)		4.068.000	11.250	0,28	224.800	210	0,09	0,34	23/77
5	ChTh (Paclitaxel)		8.055.000	11.558	0,14	254.400	285	0,11	0,78	3/97
6	ChTh (Paclitaxel)		5.905.000	44.750	0,76	345.600	4.520	1,31	1,73	71/29
7	ChTh (Paclitaxel)		4.448.500	38.180	0,86	181.600	1.897	1,04	1,22	72/28
1	vor ChTh	M-162	5.670.000	125	0,00	393.600	100	0,03	11,52	100/0
2	ChTh (Nab-Paclitaxel), Pertuzumab, Trastuzumab		17.350.000	0	0,00	329.600	0	0,00		0/0
3			4.246.500	3.300	0,08	270.400	10	0,00	0,05	4/96
4			6.600.000	2.000	0,03	264.800	26	0,01	0,33	100/0
5			4.092.000	1.250	0,03	123.200	0	0,00	0,00	0/100
6			4.255.500	750	0,02	185.600	6	0,00	0,18	5/95
7			10.945.000	0	0,00	384.000	8	0,00		100/0
8			6.810.000	250	0,00	159.200	14	0,01	2,40	36/64
9			4.206.000	2.000	0,05	172.800	32	0,02	0,39	30/70
10			4.991.500	1.000	0,02	198.400	36	0,02	0,92	33/67
11			4.509.000	4.000	0,09	207.200	46	0,02	0,25	13/87
12	Trastuzumab		4.673.000	7.250	0,16	247.200	1.806	0,73	4,71	66/34
13	Trastuzumab	6.925.000	4.750	0,07	298.400	2.638	0,88	12,89	87/13	
1	vor ChTh	M-163	4.071.000	875	0,02	509.600	0	0,00	0,00	0/100
2	vor ChTh		4.630.500	250	0,01	296.800	200	0,07	12,48	100/0
3	ChTh (Paclitaxel)		3.643.000	500	0,01	103.200	150	0,15	10,59	60/40
4	ChTh (Paclitaxel)		2.760.000	2.000	0,07	388.000	45	0,01	0,16	37/63
5	ChTh (Paclitaxel)		3.749.000	17.745	0,47	931.200	22	0,00	0,00	2/98
6	ChTh (Paclitaxel)		2.490.500	7.750	0,31	130.400	201	0,15	0,49	14/86
7	ChTh (Paclitaxel)		8.115.000	6.750	0,08	252.800	184	0,07	0,88	26/74
8	ChTh (Paclitaxel)		2.583.500	25.133	0,97	184.000	180	0,10	0,10	14/86
9	ChTh (Paclitaxel)		3.924.500	9.668	0,25	236.800	36	0,02	0,06	3/97
10	ChTh (Eribulin)		2.900.000	1.750	0,06	266.400	194	0,07	1,21	30/70
1	vor ChTh	M-164	3.191.000	0	0,00	84.000	200	0,24	24,00	100/0
2	vor ChTh		2.563.000	3.000	0,12	388.800	250	0,06	0,55	100/0
3	ChTh (Carboplatin + Paclitaxel)		1.355.500	5.740	0,42	128.800	52	0,04	0,10	11/89
4			1.053.000	3.000	0,28	217.600	12	0,01	0,02	2/98
5			2.115.000	1.500	0,07	278.400	24	0,01	0,12	11/89
6			1.363.000	2.000	0,15	120.000	20	0,02	0,11	12/88
7	Nachsorge		2.487.000	4.500	0,18	140.800	76	0,05	0,30	17/83
1	vor ChTh	M-165	7.170.000	0	0,00	403.200	50	0,01	1,00	100/0
2	vor ChTh		13.275.000	0	0,00	268.000	50	0,02	2,00	100/0
3	ChTh (Paclitaxel)		805.000	0	0,00	59.200	2	0,00		100/0
4	ChTh (Paclitaxel)		2.830.000	500	0,02	173.600	0	0,00	0,00	0/0
5	ChTh (Paclitaxel)		3.171.500	1.750	0,06	165.600	16	0,01	0,18	10/90
6	ChTh (Paclitaxel)		1.385.000	250	0,02	83.200	2	0,00	0,13	4/96
7	ChTh (Paclitaxel)		14.595.000	1.000	0,01	461.600	38	0,01	1,20	20/80
8	ChTh (Paclitaxel)		6.825.000	250	0,00	457.600	2	0,00	0,12	4/96
9	ChTh (Paclitaxel)		2.345.000	750	0,03	102.400	0	0,00	0,00	0/100

10	ChTh (Paclitaxel)		3.666.500	0	0,00	115.200	8	0,01		24/76
11	ChTh (Paclitaxel)		3.230.500	4.500	0,14	104.000	24	0,02	0,17	6/94
12	ChTh (EC)		4.446.000	0	0,00	423.200	2	0,00		7/93
13	ChTh (EC)		6.290.000	750	0,01	411.200	2	0,00	0,04	100/0
14	ChTh (EC)		2.783.500	1.250	0,04	200.000	0	0,00	0,00	0/100
1	vor ChTh	M-166	4.219.500	73.600	1,74	320.800	13.468	4,20	2,41	87/13
2	ChTh (EC), Trastuzumab		6.030.000	52.710	0,87	289.600	484	0,17	0,19	4/96
3	ChTh (Paclitaxel), Trastuzumab		12.465.000	8.250	0,07	516.800	358	0,07	1,05	19/81
4			4.957.000	7.650	0,15	239.200	12	0,01	0,03	1/99
5			4.014.500	5.750	0,14	186.400	362	0,19	1,36	30/70
6			12.500.000	2.250	0,02	575.200	12	0,00	0,12	2/98
7			3.152.500	500	0,02	328.000	4	0,00	0,08	2/98
8	Trastuzumab		4.488.500	4.750	0,11	300.800	308	0,10	0,97	71/29
9	Trastuzumab		5.025.000	3.500	0,07	404.800	200	0,05	0,71	80/20
1	vor ChTh	M-167	3.822.000	46.650	1,22	165.600	1.658	1,00	0,82	24/76
2	vor ChTh		5.355.000	8.000	0,15	173.600	419	0,24	1,62	77/23
3	ChTh (Paclitaxel), Trastuzumab		2.583.000	4.000	0,15	119.200	120	0,10	0,65	11/89
4			3.400.500	0	0,00	96.800	0	0,00		0/100
5			2.317.000	0	0,00	120.000	2	0,00		100/0
6			2.043.000	1.750	0,09	169.600	74	0,04	0,51	12/88
7			3.778.500	7.000	0,19	289.600	110	0,04	0,20	12/88
8	ChTh (EC), Trastuzumab		1.950.000	5.750	0,29	217.600	331	0,15	0,52	28/72

(CETCs – *circulating epithelial tumor cells*; k.A. – keine Angaben; PF - Positivfraktion; NF – Negativfraktion;
ChTh – Chemotherapie; EC – Epirubicin/Cyclophosphamid; FEC – Fluorouracil/Epirubicin/Cyclophosphamid;
TAC - Docetaxel/Doxorubicin/Cyclophosphamid)

Auflistung der CETC-Zahl pro ml Blut und deren Wechselwirkung mit magnetischen Nanopartikeln am Beispiel der Mammakarzinompatientin M-166 im Verlauf einer Chemotherapie (siehe Abb. 28)

Messung			CETCs pro ml Blut	Zellanteile in den Fraktionen [%]		CETC-Anteile in den Fraktionen [%]	
#	Datum	Therapie		PF	NF	PF	NF
1	29.07.2013	vor Therapiebeginn	73.600	14	86	87	13
2	08.08.2013	ChTh (EC)	52.710	8	92	4	96
3	28.08.2013	ChTh (EC)	1.000	keine MACS-Separation durchgeführt			
4	04.09.2013	ChTh (EC)	750	keine MACS-Separation durchgeführt			
5	15.11.2013	ChTh (Paclitaxel), Trastuzumab	8.250	7	93	19	81
6	22.11.2013	ChTh (Paclitaxel), Trastuzumab	7.650	8	92	1	99
7	29.11.2013	ChTh (Paclitaxel), Trastuzumab	5.750	8	92	30	70
8	06.12.2013	ChTh (Paclitaxel), Trastuzumab	2.250	7	93	2	98
9	13.12.2013	ChTh (Paclitaxel), Trastuzumab	500	18	82	2	98
10	20.12.2013	ChTh (Paclitaxel), Trastuzumab	8.250	7	93	59	41
11	27.03.2014	Trastuzumab	4.750	11	89	71	29
12	17.04.2014	Trastuzumab	3.500	14	86	80	20

(CETCs – *circulating epithelial tumor cells*; PF - Positivfraktion; NF – Negativfraktion;
ChTh – Chemotherapie; EC – Epirubicin/Cyclophosphamid)

A-2 Auflistung der p-Werte und Standardabweichungen

Statistische Auswertung

Für die Untersuchung der prozentualen Anreicherung der tumorverdächtigen Zellen zur Gesamtzellzahl vor und nach der MACS-Separation wurde der Mann-Whitney-U Test verwendet. Mit dem parameterfreien statistischen Homogenitätstest kann die Zugehörigkeit zweier unabhängiger Verteilungen zur Grundgesamtheit beurteilt werden. Dabei werden p-Werte kleiner 0,05 als statistisch signifikant bewertet (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Darstellung der p-Werte für Patienten in verschiedenen Therapiezuständen (siehe Abb. 21)

vor / nach Anreicherung	vor OP (n=19)	Chemo- therapie (n=39)	vor Radiatio (n=16)	nach Radiatio (n=9)	Trastuzu- mab (n=87)	Zoledron- säure (n=84)	Nachsorge (n=65)
vor / vor Anreicherung							
nach / nach Anreicherung							
vor OP (n=19)	0,003 *	0,312	0,830	0,431	0,429	0,008 **	0,128
Chemotherapie (n=39)	0,034 *	0,000 ***	0,291	0,146	0,036	0,000 ***	0,003 **
vor Radiatio (n=16)	0,829	0,022 *	0,007 **	0,718	0,746	0,70	0,346
nach Radiatio (n=9)	0,336	0,012 *	0,335	0,171	0,739	0,278	0,987
Trastuzumab (n=87)	0,977	0,001 ***	0,869	0,310	0,000 ***	0,014 *	0,372
Zoledronsäure (n=84)	0,925	0,001 ***	0,806	0,263	0,954	0,000 ***	0,120
Nachsorge (n=65)	0,716	0,001 ***	0,514	0,317	0,519	0,515	0,000 ***

Darstellung der p-Werte für Patienten während Chemotherapie (siehe Abb. 23)

vor / nach Anreicherung	FEC (n=5)	EC (n=6)	Paclitaxel (n=14)	Docetaxel (n=13)
vor / vor Anreicherung				
nach / nach Anreicherung				
FEC (n=5)	1,000	0,271	0,004 **	0,060
EC (n=6)	0,337	0,015 *	0,035	0,539
Paclitaxel (n=14)	0,545	0,038 *	0,001 ***	0,198
Docetaxel (n=13)	1,000	0,225	0,434	0,015 *

(EC - Epidoxorubicin/ Cyclophosphamid; FEC - Fluorouracil/ Epidoxorubicin/ Cyclophosphamid)

Darstellung der p-Werte für Patienten im Chemotherapieverlauf (siehe Abb. 26)

vor / nach Anreicherung	vor Chemotherapie (n=11)	während Chemotherapie (n=53)	nach Chemotherapie (n=4)
vor / vor Anreicherung			
nach / nach Anreicherung			
vor Chemotherapie (n=11)	0,275	0,011 *	0,433
während Chemotherapie (n=53)	0,622	0,006 **	0,014 *
nach Chemotherapie (n=4)	0,429	0,433	0,561

Standardabweichungen und Quantile ($Q_{0,25}$, $Q_{0,5}$, $Q_{0,75}$)*Standardabweichungen für unterschiedlich umhüllte Nanopartikel (siehe Abb. 11)*

	MNP	MNP@CMD	MNP@CMP	MNP@CMC
(A)				
Positivfraktion [%]	82 ± 5,14	8 ± 5,12	26 ± 5,42	49 ± 11,54
Negativfraktion [%]	18 ± 5,14	92 ± 5,12	74 ± 5,42	51 ± 11,54
(B)				
CETCs [%]	100 ± 1,42	86 ± 13,13	85 ± 8,90	91 ± 4,70
Leukozyten [%]	82 ± 5,24	7 ± 5,22	25 ± 5,64	49 ± 11,55
(C)				
Zellverlust [%]	76 ± 5,98	35 ± 14,40	44 ± 10,02	48 ± 11,40

Standardabweichungen für unterschiedliche Inkubationszeiten (siehe Abb. 12)

	4 min	8 min	12 min
(A)			
95/5 [%]	34 ± 5,53	52 ± 9,63	63 ± 6,77
99,5/0,5 [%]	39 ± 5,42	50 ± 8,60	66 ± 3,55
99,95/0,05 [%]	42 ± 0,25	64 ± 5,94	80 ± 1,25
(B)			
95/5 [%]	74 ± 2,21	83 ± 4,02	89 ± 5,63
99,5/0,5 [%]	82 ± 11,11	88 ± 0,63	95 ± 5,00
99,95/0,05 [%]	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100 ± 0,00
(C)			
95/5 [%]	34 ± 4,39	57 ± 3,43	61 ± 13,12
99,5/0,5 [%]	30 ± 2,05	62 ± 4,69	80 ± 9,28
99,95/0,05 [%]	32 ± 6,73	63 ± 1,87	84 ± 0,76

Standardabweichungen für unterschiedliche Plasmakonzentrationen (siehe Abb. 13)

	4 min	+ 6 min Inkubation mit Plasma [%]			
	0 %	0 %	2,5 %	5 %	8 %
(A)					
Positivfraktion [%]	26 ± 5,12	67 ± 11,29	22 ± 7,66	20 ± 10,24	25 ± 7,30
Negativfraktion [%]	74 ± 5,12	33 ± 11,29	78 ± 7,66	80 ± 10,24	75 ± 7,30
(B)					
CETCs [%]	83 ± 20,65	92 ± 4,66	97 ± 11,61	100 ± 4,60	100 ± 3,65
Leukozyten [%]	26 ± 5,23	67 ± 11,39	21 ± 7,40	20 ± 10,09	25 ± 7,28
(C)					
Zellverlust [%]	40 ± 21,32	41 ± 19,49	27 ± 15,22	32 ± 19,32	28 ± 17,66

Standardabweichungen für unterschiedliche Plasmakonzentrationen (siehe Abb. 14)

	10 min Inkubation mit Plasma [%]			
	0 %	2,5 %	5 %	8 %
(A)				
Positivfraktion [%]	67 ± 11,29	16 ± 4,18	11 ± 2,39	15 ± 10,07
Negativfraktion [%]	33 ± 11,29	84 ± 4,18	89 ± 2,39	85 ± 10,07
(B)				
CETCs [%]	92 ± 4,66	88 ± 17,27	91 ± 12,19	95 ± 5,80
Leukozyten [%]	67 ± 11,39	15 ± 3,95	11 ± 2,32	15 ± 10,04
(C)				
Zellverlust [%]	41 ± 19,49	36 ± 15,73	24 ± 27,32	23 ± 17,03

Median und 25 % / 75 % Quartile für Mammakarzinompatientinnen (siehe Abb. 18)

	Positivfraktion			Negativfraktion		
	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$
(A)						
In den Fraktionen [%]	11	8	815	89	85	92
(B)						
CETCs [%]	80	50	100	20	0	50
Leukozyten [%]	11	8	15	89	85	92
(C)						
Zellverlust [%]	Median = 16; $Q_{0,25}$ = 12; $Q_{0,75}$ = 21					

($Q_{0,25}$ – 25 % Quartil; $Q_{0,75}$ – 75 % Quartil; \tilde{x} – Median)

Median und 25 % / 75 % Quartile für therapieabhängige Anreicherung (siehe Abb. 20)

	(A) Positivfraktion bzw. (B) CETCs			(A) Negativfraktion bzw. (B) Leukozyten		
	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$
(A)						
vor OP (n=19)	11	7	17	89	83	93
Chemotherapie (n=39)	11	7	16	89	84	93
vor Radiatio (n=16)	10	7	14	90	86	93
nach Radiatio (n=9)	12	11	18	88	82	89
Trastuzumab (n=87)	12	9	17	88	83	91
Zoledronsäure (n=84)	11	9	15	89	85	91
Nachsorge (n=65)	12	9	15	88	85	91
(B)						
vor OP (n=19)	100	80	100	11	8	17
Chemotherapie (n=39)	54	30	84	11	7	16
vor Radiatio (n=16)	82	69	89	9	7	14
nach Radiatio (n=9)	95	75	100	11	10	17
Trastuzumab (n=87)	80	55	100	12	8	16
Zoledronsäure (n=84)	89	70	100	11	8	15
Nachsorge (n=65)	83	63	100	12	9	15

($Q_{0,25}$ – 25 % Quartil; $Q_{0,75}$ – 75 % Quartil; \tilde{x} – Median)

Median und 25 % / 75 % Quartile für Anreicherungsverhältnis und -faktor unterschiedlicher Therapien (siehe Tab. 15)

	<i>Nicht-separierte Fraktion vor der Anreicherung</i>								
	Gesamtzellzahl pro ml Blut			CETC-Zellzahl pro ml Blut			%		
	\tilde{x}	Q_{0,25}	Q_{0,75}	\tilde{x}	Q_{0,25}	Q_{0,75}	\tilde{x}	Q_{0,25}	Q_{0,75}
alle Therapieformen (n=390)	3.987.000	2.960.875	5.906.250	3.600	1.400	9.000	0,08	0,03	0,22
vor OP (n=19)	3.349.500	2.505.125	4.016.000	3.200	1.000	9.200	0,08	0,04	0,21
Chemotherapie (n=39)	3.677.750	3.083.875	5.120.000	1.800	600	4.000	0,02	0,02	0,17
vor Radiatio (n=16)	4.336.000	3.407.375	5.421.250	2.900	1.550	11.327	0,06	0,04	0,14
nach Radiatio (n=9)	3.425.500	2.335.000	3.979.000	5.000	1.600	16.128	0,22	0,04	0,71
Trastuzumab (n=87)	3.853.000	2.803.500	5.315.000	4.600	2.000	10.000	0,08	0,04	0,31
Zoledronsäure (n=84)	4.160.500	3.017.000	6.520.000	5.200	1.750	9.050	0,11	0,03	0,19
Nachsorge (n=65)	4.517.500	3.254.000	7.082.500	5.000	2.448	10.800	0,12	0,06	0,24
	<i>Angereicherte Fraktion nach MACS-Separation</i>								
	Gesamtzellzahl in PF			CETC-Zellzahl in PF			%		
	\tilde{x}	Q_{0,25}	Q_{0,75}	\tilde{x}	Q_{0,25}	Q_{0,75}	\tilde{x}	Q_{0,25}	Q_{0,75}
alle Therapieformen (n=390)	216.800	150.600	292.000	800	300	2.200	0,39	0,13	1,01
vor OP (n=19)	185.600	121.600	256.800	400	200	1.050	0,30	0,12	0,53
Chemotherapie (n=39)	224.000	158.000	326.000	500	200	1.198	0,28	0,06	0,51
vor Radiatio (n=16)	251.200	201.400	398.400	900	375	1.425	0,38	0,20	0,58
nach Radiatio (n=9)	257.600	221.600	288.800	1.000	600	2.300	0,39	0,24	1,01
Trastuzumab (n=87)	203.200	147.200	272.400	700	300	2.050	0,36	0,12	0,98
Zoledronsäure (n=84)	217.200	158.400	261.200	1.350	575	2.875	0,74	0,22	1,39
Nachsorge (n=65)	216.000	163.200	292.000	1.100	400	2.300	0,41	0,17	0,93
	<i>Anreicherungsfaktor [%]</i>								
	\tilde{x}	Q_{0,25}		Q_{0,75}					
alle Therapieformen (n=390)	4,24	1,78		11,15					
vor OP (n=19)	4,27	1,20		6,98					
Chemotherapie (n=39)	4,44	1,67		6,63					
vor Radiatio (n=16)	4,93	2,64		7,18					
nach Radiatio (n=9)	2,17	1,48		3,53					
Trastuzumab (n=87)	2,96	1,25		10,66					
Zoledronsäure (n=84)	7,22	2,24		15,26					
Nachsorge (n=65)	3,73	1,91		10,18					

(CETCs- circulating epithelial tumor cells; PF – Positivfraktion; Q_x – x % Quartil; \tilde{x} – Median)

Median und 25 % / 75 % Quartile für Patienten in unterschiedlichen Chemotherapien (siehe Abb. 22)

	<i>CETCs</i>			<i>Leukozyten</i>		
	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$
FEC (n=5)	50	10	60	7	5	9
EC (n=6)	40	30	59	13	11	15
Paclitaxel (n=14)	62	30	94	12	8	16
Docetaxel (n=13)	63	52	94	14	7	16

(CETCs- circulating epithelial tumor cells; EC – Epidoxorubicin/ Cyclophosphamid;
FEC – Fluorouracil / Epidoxorubicin/ Cyclophosphamid; Q_x – x % Quartil; \tilde{x} – Median)

Median und 25 % / 75 % Quartile für Anreicherungsverhältnis und -faktor unterschiedlicher Chemotherapien (siehe Tab. 17)

	<i>Nicht-separierte Fraktion vor der Anreicherung</i>								
	Gesamtzellzahl pro ml Blut			CETC-Zellzahl pro ml Blut			%		
	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$
FEC (n=5)	3.689.000	2.151.125	5.433.750	2.600	0	3.400	0,04	0,03	0,12
EC (n=6)	4.612.000	4.612.000	4.612.000	700	250	2.500	0,01	0,02	0,02
Paclitaxel (n=14)	3.439.250	3.033.500	4.137.750	2.500	1.400	4.500	0,04	0,04	0,16
Docetaxel (n=13)	4.283.000	3.430.750	5.612.500	1.248	600	4.400	0,02	0,01	0,18
	<i>Angereicherte Fraktion nach MACS-Separation</i>								
	Gesamtzellzahl in PF			CETC-Zellzahl in PF			%		
	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$
FEC (n=5)	140.800	127.200	238.400	100	0	200	0,06	0,00	0,07
EC (n=6)	117.891	209.000	362.000	300	200	625	0,10	0,05	0,30
Paclitaxel (n=14)	187.200	147.800	262.600	1.000	500	1.749	0,46	0,23	0,70
Docetaxel (n=13)	290.400	205.600	359.200	1.000	100	1.300	0,29	0,06	0,58
	<i>Anreicherungsfaktor [%]</i>								
	\tilde{x}		$Q_{0,25}$		$Q_{0,75}$				
FEC (n=5)	0,03		0,00		0,58				
EC (n=6)	2,26		2,26		2,26				
Paclitaxel (n=14)	5,66		3,76		9,15				
Docetaxel (n=13)	3,63		1,79		7,47				

(CETCs- circulating epithelial tumor cells; EC – Epidoxorubicin/ Cyclophosphamid;
FEC – Fluorouracil / Epidoxorubicin/ Cyclophosphamid; Q_x – x % Quartil; \tilde{x} – Median)

Median und 25 % / 75 % Quartile für Patientin im Verlauf einer Chemotherapie (siehe Abb. 24+25)

	Positivfraktion			Negativfraktion			Zellzahl/ml Blut		
	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$
vor Chemotherapie (n=11)	14	9	15	86	85	91	4.219.500	3.506.500	5.512.500
während Chemotherapie (n=53)	9	7	13	91	87	93	3.778.500	2.583.500	5.905.000
nach Chemotherapie (n=4)	10	8	12	90	88	92	4.849.000	4.626.875	5.500.000
	CETCs			Leukozyten					
	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$			
vor Chemotherapie (n=11)	82	72	100	10	6	14			
während Chemotherapie (n=53)	12	4	30	9	6	13			
nach Chemotherapie (n=4)	76	70	82	9	7	12			

(CETCs- circulating epithelial tumor cells; Q_x – x % Quartil; \tilde{x} – Median)

Median und 25 % / 75 % Quartile für Anreicherungsverhältnis und -faktor im Verlauf einer Chemotherapie (siehe Tab. 18)

	Nicht-separierte Fraktion vor der Anreicherung								
	Gesamtzellzahl pro ml Blut			CETC-Zellzahl pro ml Blut			%		
	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$
vor Therapie (n=11)	4.219.500	3.506.500	5.512.500	2.875	63	5500	0,02	0,00	0,13
während Therapie (n=53)	3.778.500	2.583.500	5.905.000	2.000	500	5750	0,06	0,01	0,15
nach Therapie (n=4)	4.849.000	4.626.875	5.500.000	4.750	4438	5375	0,09	0,07	0,12
	Angereicherte Fraktion nach MACS-Separation								
	Gesamtzellzahl in PF			CETC-Zellzahl in PF			%		
	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$
vor Therapie (n=11)	296.800	197.200	391.200	335	75	460	0,07	0,02	0,24
während Therapie (n=53)	215.200	140.800	289.600	26	6	150	0,01	0,00	0,07
nach Therapie (n=4)	299.600	285.600	326.800	1.057	281	2.014	0,42	0,09	0,77
	Anreicherungsfaktor [%]								
	\tilde{x}			$Q_{0,25}$			$Q_{0,75}$		
vor Therapie (n=11)	2,00			0,91			6,97		
während Therapie (n=53)	0,19			0,09			0,68		
nach Therapie (n=4)	2,84			0,90			6,75		

(CETCs- circulating epithelial tumor cells; PF – Positivfraktion; Q_x – x % Quartil; \tilde{x} – Median)

Median und 25 % / 75 % Quartile für CETC-Vitalität im Verlauf einer Chemotherapie (siehe Abb. 27)

	<i>CETCs lebend [%]</i>			<i>CETCs tot [%]</i>		
	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$	\tilde{x}	$Q_{0,25}$	$Q_{0,75}$
<i>Unsepariert</i>						
vor Chemotherapie (n=11)	25	0	53	75	47	100
während Chemotherapie (n=53)	13	4	29	87	71	96
nach Chemotherapie (n=4)	5	4	6	95	94	96
<i>Positivfraktion</i>						
vor Chemotherapie (n=11)	50	0	68	50	33	100
während Chemotherapie (n=53)	8	0	25	92	75	100
nach Chemotherapie (n=4)	9	4	15	91	85	96
<i>Negativfraktion</i>						
vor Chemotherapie (n=11)	40	25	50	60	50	75
während Chemotherapie (n=53)	17	3	33	83	67	97
nach Chemotherapie (n=4)	44	28	58	56	43	72

(CETCs- circulating epithelial tumor cells; Q_x – x % Quartil; \tilde{x} – Median)

A-3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Walther (geb. Voigt)
 Vorname: Katharina
 Anschrift: Zum Mühlgraben 3, 07751 Jena
 Telefon: 03641/664605
 E-Mail: katharina.walther@med.uni-jena.de
 Geburtsdatum: 10.10.1984
 Geburtsort: Jena

Werdegang

seit 08/2010 **Universitätsklinikum Jena**, Deutschland

10/2005 – 10/2009 **Ernst-Abbe-Fachhochschule Jena**, Deutschland
 Akademischer Grad: Diplom-Ingenieurin (FH)
 Studiengang: Pharma-Biotechnologie
 Abschlussnote: 1,6

09/2001 – 02/2005 **Staatl. Berufsbildendes Schulzentrum Jena-Göschwitz**, Deutschland
 Doppelqualifizierung als technische Assistentin für Informatik mit Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
 Abschlussnote: 2,2

Praktische Erfahrungen

seit 01/2011 **Promotion am Universitätsklinikum Jena**
 Forschungszentrum Lobeda im Universitätsklinikum Jena, Abt. Hämatologie und Internistische Onkologie, Deutschland
„Magnetbasierte Anreicherung von zirkulierenden epithelialen tumorverdächtigen Zellen und deren Genotypisierung“

08/2010 – 12/2010 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Universitätsklinikum Jena**
 Forschungszentrum Lobeda im Universitätsklinikum Jena, Abt. Hämatologie und Internistische Onkologie, Deutschland
„Resistenzmechanismen der chronischen myeloischen Leukämie“

11/2009 – 04/2010 **Auslandspraktikum**
 The Scripps Research Institute, Abt. Zellbiologie, San Diego, USA
„Detektion und Isolation zirkulierender Tumorzellen von Karzinompatienten“

08/2008 – 10/2009 **Diplom- und Praxissemester**
 Forschungszentrum Lobeda im Universitätsklinikum Jena, Abt. Hämatologie und Internistische Onkologie, Deutschland
"Epigenetische Regulation der Expression von BMP-5 in Lungenkarzinomen"

Jena, den 08.05.2014

A-4 Veröffentlichungen

Publikationen

Marrinucci D, Bethel K, Kolatkar A, Luttgen MS, Malchiodi M, Baehring F, Voigt K, Lazar D, Nieva J, Bazhenova L, Ko AH, Korn WM, Schram E, Coward M, Yang X, Metzner T, Lamy R, Honnatti M, Yoshioka C, Kunken J, Petrova Y, Sok D, Nelson D, Kuhn P. Fluid biopsy in patients with metastatic prostate, pancreatic and breast cancers. *Phys Biol*. 2012 Feb;9(1):016003.

Steinbach C, Steinbrücker C, Pollok S, Walther K, Clement JH, Chen Y, Petersen I, Popp J, Weber K. *KRAS* mutation screening by chip-based DNA hybridization - a further step towards personalized oncology. *Submitted*

Vorträge

Voigt K, Konowski P, Wotschadlo J, Jörke C, Schwalbe M, Pachmann K, Liebert T, Hochhaus A, Clement JH (2012)

CMD-coated magnetic nanoparticles - A tool for quantitative magnetic assisted depletion of circulating epithelial tumor cells from peripheral blood. *Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie* (19.-23. Oktober 2012, Stuttgart)

Voigt K, Wotschadlo J, Konowski P, Schwalbe M, Pachmann K, Liebert T, Heinze T, Hochhaus A, Clement JH (2012)

CMD-coated magnetic nanoparticles – A tool for quantitative magnetic assisted depletion of circulating epithelial tumor cells from peripheral blood. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien* (01.-03. November 2012, Hamburg)

Poster

Voigt K, Wagner K, Sängler J, Höffken K, Clement JH (2009)

Differenzielle epigenetische Regulation von BMPs im Lungenkarzinom. *6. Tag der Nachwuchswissenschaftler 2009* (29. Juni 2009, Jena)

Wagner K, Voigt K, Sängler J, Schmidt A, Schneider CP, Hochhaus A, Clement JH (2010)

Expression and epigenetic regulation of the BMP5 gene in non-small cell lung cancer (NSCLC) *CLCGP conference Cancer Genomics and Clinical Care* (15.-16. November, Köln)

Bähring F, Wotschadlo J, Voigt K, Seyfarth L, Fischer D, Bergemann C, Hochhaus A, Clement JH (2011)

Development of a standardized cell-based test system for nanoparticles – evaluating the toxic endpoint. *11th German Ferrofluid Workshop* (28.-30. September 2011, Benediktbeuern)

Voigt K, Konowski P, Wotschadlo J, Jörke C, Schwalbe M, Pachmann K, Liebert T, Heinze T, Hochhaus A, Clement JH (2012)

CMD-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles – A useful tool for quantitative magnetic assisted depletion of circulating epithelial tumor cells from peripheral blood. *1st Workshop - NanoMed – Safety of Nanoscale Materials in Medicine* (26.-27. Juni 2012, Jena)

Voigt K, Wotschadlo J, Konowski P, Schwalbe M, Pachmann K, Liebert T, Heinze T, Hochhaus A, Clement JH (2012)

Success of magnetic assisted epithelial cell sorting depends on the nanoparticle shell and the therapeutic regiment. *12th German Ferrofluid Workshop (26.-28. September 2012, Benediktbeuern)*

Voigt K, Wotschadlo J, Konowski P, Schwalbe M, Pachmann K, Liebert T, Heinze T, Hochhaus A, Clement JH (2012)

CMD-coated magnetic nanoparticles – A tool for quantitative magnetic assisted depletion of circulating epithelial tumor cells from peripheral blood. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien (01.-03. November 2012, Hamburg)*

Voigt K, Konowski P, Wagner K, Ernst T, Wotschadlo J, Liebert T, Eberhardt J, Hochhaus A, Clement JH (2013)

Single cell sequencing of rare cells after magnetic enrichment. *9th International Symposium on Minimal Residual Cancer (24.-27. September 2013, Paris)*

Voigt K, Konowski P, Wagner K, Ernst T, Wotschadlo J, Liebert T, Eberhardt J, Hochhaus A, Clement JH (2013)

Single cell sequencing of rare cells after magnetic enrichment. *Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie (18.-22. Oktober 2013, Wien)*

A-5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Dr. rer. biol. hum. Joachim Clement, KIM II, Abt. Hämatologie und Internistische Onkologie, Universitätsklinikum Jena

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

A-6 Danksagung

„Dankbarkeit ist ein ausgeprägter Sinn für Gefälligkeiten, die noch ausstehen.“

François VI. Duc de La Rochefoucauld (1613 - 1680), franz. Offizier, Diplomat und Schriftsteller

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hochhaus und Prof. Dr. Liebmann für die Vergabe des Themas sowie die Übernahme der Gutachterfunktion.

Besonders möchte ich mich bei meinem wissenschaftlichen Betreuer Herr Dr. Clemtent für die außergewöhnliche Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas bedanken sowie für das entgegengebrachte Vertrauen von Anfang an.

Allen Mitwirkenden des MiNa-CTC Projektes danke ich für die tolle Zusammenarbeit, besonders Tina Schlicksbier und Nadine Taubert.

Mein aufrichtiger und großer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe des Onkologischen Forschungslabors für die außergewöhnlich angenehme Arbeitsatmosphäre und eine ganz tolle Zeit. Besonders Janine Ziermann, Kathleen Wagner, Cornelia Jörk, Anja Waldau und Bärbel Spies-Weißhart möchte ich für das freundschaftliche Arbeitsverhältnis und die allseits beratenden und aufmunternden Worte danken. Pia Konowski bin ich überaus dankbar für die wertvolle Zusammenarbeit und fleißigen Zuarbeiten. Jana Wotschadlo möchte ich für die Einführung in die Welt der „süßen Köder“ danken und die immer bereitwillige Unterstützung bei Problemen und Fragen. Meinen lieben Kolleginnen Vivien Schäfer, Nadine Rüdiger und Jenny Rinke möchte ich für die großartige Zeit im gemeinsamen Büro danken. Neben dem wissenschaftlichen Beistand zu praktischen und theoretischen Fragen, bin ich über die entstandenen Freundschaften besonders dankbar. Danke für alle Ratschläge, Ideen und motivierenden Worte.

Ein herzliches Dankeschön gilt meinen tollen Freunden.

Den größten Dank von allen empfinde ich für meinen Ehemann Steffen Walther und meine liebe Familie. Euer bedingungsloser Glaube an mich und die zu jeder Zeit vorhandene Unterstützung und liebevollen Wort haben mir die Kraft und das Vertrauen für alles gegeben.